

## ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

«ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΥ ΒΡΩΜΗΣ ΠΡΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΑΛΤΟΖΗΣ»

ΑΝΝΑ ΠΑΤΣΙΟΥΡΑ

Περιβαλλοντολόγος, MSc

ΧΑΝΙΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2011

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Γκέκας Βασίλειος, Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου.

Καθηγητής Μαντζαβίνος Διονύσιος, Τομέας Περιβαλλοντικής Διαχείρισης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Καθηγητής Μπιλιαδέρης Κωνσταντίνος, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Λέκτορας Βενιέρη Δανάη, Τομέας Περιβαλλοντικής Διαχείρισης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Επίκουρος Καθηγητής Γκίκας Πέτρος, Τομέας Περιβαλλοντικής Διαχείρισης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Καθηγητής Καλλίθρακας-Κόντος Νικόλαος, Τομέας Χημείας, Γενικό Τμήμα, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Λέκτορας Παρανυχιανάκης Νικόλαος, Τομέας Περιβαλλοντικής Υδραυλικής και Γεωπεριβαλλοντικής Μηχανικής, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Στους γονείς μου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαινομένων Μεταφοράς και Εφαρμοσμένης Θερμοδυναμικής του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Ελεγχος Ποιότητας και Διαχείριση Περιβάλλοντος", και για χρονική διάρκεια από 10/2005 έως σήμερα. Ένα μεγάλο τμήμα της χρηματοδοτήθηκε από τη σουηδική εταιρεία OATLY AB για το χρονικό διάστημα από 01/2006 έως 01/2008, και ένα δεύτερο τμήμα της πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν επιστημονικά, υλικά, αλλά και ηθικά σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Γκέκα Βασίλειο για την ανάθεση και συνεχή επίβλεψη της διατριβής, τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και για την άριστη συνεργασία μας καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για τις δυνατότητες που μου παρείχε να συνεργαστώ με τη σουηδική εταιρεία OATLY AB, να επισκεφθώ το Πανεπιστήμιο του Λουντ και τη Γεωπονική Σχολή του ΑΠΘ, αλλά και για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαντζαβίνο Διονύσιο για τη συνέχιση της επίβλεψης της διατριβής μου και για τη βοήθεια ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Μπιλιαδέρη Κωνσταντίνο, καθότι μου προσέφερε ουσιαστική καθοδήγηση ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, αλλά και για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας (ΑΠΘ) για το διάστημα πέντε μηνών. Επιπλέον, τον ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία και τη συνεχή επίβλεψη κατά τη διεξαγωγή σημαντικού τμήματος πειραμάτων της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, Επίκουρο Καθηγητή κ. Γκίκα Πέτρο, Λέκτορα κ. Βενιέρη Δανάη, Λέκτορα κ. Παρανυχιανάκη Νίκο, και του Γενικού τμήματος, Καθηγητή κ. Καλλίθρακα-Κόντο Νικόλαο, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Επταμελή Επιτροπή Αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ πολύ τη σουηδική εταιρεία OATLY AB για τη συνεργασία αλλά και για τη χορήγηση υποτροφίας για δύο έτη, για την οικονομική στήριξη της εν λόγω έρευνας. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Öste Rickard, Bergenståhl Bjorn και τη Δρ. Τριανταφύλλου-Öste Αγγελική.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Λέκτορα Λαζαρίδου Αθηνά, για τις σημαντικές συμβουλές και γνώσεις που μου προσέφερε, αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε κατά τη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ, στα πλαίσια διεξαγωγής των πειραμάτων. Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γαλανάκη Χάρη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εκπόνηση του διδακτορικού μου, την άριστη συνεργασία μας, αλλά και για τις άπειρες συζητήσεις επιστημονικού περιεχομένου. Επίσης, οφείλω τις ευχαριστίες μου στους προπτυχιακούς φοιτητές Μανιάτη Γιώργο και Ρέππα Στάθη για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν στα πλαίσια ανάπτυξης του μαθηματικού μοντέλου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Παπαδοπούλου Αφροδίτη για τη βοήθειά της σε διαδικαστικά θέματα του εργαστηρίου, τη Λέκτορα Πεντάρη Δέσποινα για τη χρησιμοποίηση της φυγόκεντρου στο εργαστήριο Ανόργανης και Οργανικής Γεωχημείας και Οργανικής Πετρογραφίας του τμήματος Μηχανικών Ορυκτών Πόρων. Ευχαριστώ επίσης τον χημικό, MSc Χαζιράκη Παναγιώτη για την πολύτιμη βοήθειά του στις μετρήσεις ολικού αζώτου. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια Δρ. Σημαντηράκη Φωτεινή για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε γνώσεις υπολογιστή κατά το τελικό στάδιο ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Πατώνη Μαρία και την Ξηράκη

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τους γονείς μου, Βασίλη και Καίτη, για τη συνεχή ηθική και οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν, αλλά και για την κατανοήση που έδειξαν απέναντί μου όλο αυτό το διάστημα.

**Πατσιούρα Άννα** Χανιά, Ιανουάριος 2011

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προϊόντα βρώμης συντελούν κατά ένα μεγάλο βαθμό στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας· οι ευεργετικές τους ιδιότητες σχετίζονται κυρίως με τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης του αίματος. Μία Σουηδική εταιρεία (OATLY AB) εφαρμόζει ένα πολυενζυμικό σύστημα για την παραγωγή ενός μη-γαλακτοκομικού προϊόντος, του γάλακτος βρώμης. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η εταιρεία μας χρηματοδότησε προκειμένου να ερευνήσουμε τη δυνατότητα βελτιστοποίησης της γραμμής παραγωγής που ακολουθείται στη συγκεκριμένη βιομηχανία, έχοντας ως παράμετρο απόκρισης την περιεκτικότητα σε μαλτόζη στο τελικό προϊόν. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνεισφέρουν σημαντικά στην κατανόηση του συγκεκριμένου τρόπου δράσης των ενζύμων και εν συνεχεία αποτελούν μέσο για την καλύτερη δυνατή πρόβλεψη της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αλεύρου βρώμης (Avena sativa) -και τρία κοκκομετρικά κλάσματα αυτού- καθώς και δύο βιομηχανικά ενζυμικά σκευάσματα, η α-αμυλάση και η β-αμυλάση, σε τρεις συνδυασμούς. Μελετήθηκαν οι κινητικές της ενζυμικής υδρόλυσης των υδατικών εναιωρημάτων αλεύρου βρώμης [συγκέντρωση: 10% (w/w), θερμοκρασία: 60 °C] και οι παραγόμενοι ολιγοσακχαρίτες (γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη) προσδιορίστηκαν με χρήση της HPLC αναλυτικής μεθόδου. Επίσης μελετήθηκαν, η ρεολογική συμπεριφορά και οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των εναιωρημάτων, αλλά και η μεταβολή του ιξώδους συναρτήσει του χρόνου υπό σταθερό ρυθμό διάτμησης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης. Πρόσθετες παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το χρώμα, και η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες και το ολικό άμυλο.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κινητικής της ενζυμικής υδρόλυσης έδειξαν ότι το ποσοστό παραγόμενης μαλτόζης ήταν αρκετά αυξημένο (60%) στην περίπτωση της συνδυασμένης δράσης των δύο αμυλασών, ενώ το υψηλότερο ποσοστό παραγόμενης μαλτοτριόζης (25%) παρατηρήθηκε κατά τη δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης (μόνη της), σε αντίθεση με τη γλυκόζη και τη μαλτοτετραόζη που εμφανίστηκαν σε αρκετά χαμηλότερα ποσοστά. Μελετώντας τη ρεολογική συμπεριφορά παρατηρήθηκε μία απότομη μείωση του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης, υπό τη δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης. Από την άλλη μεριά, η β-αμυλάση είχε μικρή επίδραση στις ρεολογικές ιδιότητες των υδατικών εναιωρημάτων αλεύρου βρώμης. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν μία ρεολογική συμπεριφορά η οποία είναι χαρακτηριστική για τα ψευδοπλαστικά ρευστά. Τα μηχανικά φάσματα για τα υδρολύματα

των αλεύρων βρώμης παρουσίασαν την κλασική ιξωδοελαστική συμπεριφορά που παρουσιάζουν όλα τα υδατικά συστήματα διασποράς μακρομορίων, όπου το G'' (ιξώδης συνιστώσα) ήταν μεγαλύτερο από το G' (συνιστώσα ελαστικότητας). Και οι δύο συνιστώσες (G' και G'') αυξάνονταν αυξανομένης της συχνότητας, ενώ στις περισσότερες των περιπτώσεων (σε υψηλές τιμές συχνότητας) η συμπεριφορά τους προσέγγιζε εκείνη των ελαστικών σωμάτων (στερεά), όπου G'>G''.

Ένα δεύτερο τμήμα της διατριβής αφορά τη μελέτη της εφαρμογής της υπερδιήθησης σε βγλυκάνες μεγάλου μοριακού βάρους, με απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίηση ανάκτησής τους από το παραπροϊόν της βιομηχανίας βρώμης. Σε πρώτη φάση παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης και εφαρμόστηκαν σε ένα κελί κάθετης ροής χρησιμοποιώντας τρεις τύπους μεμβρανών (αναγεννημένης κυτταρίνης, πολυαιθεροσουλφόνης και πολυσουλφόνης) για διάφορες τιμές δια-μεμβρανικής πίεσης. Η βελτιστοποίηση επιτεύχθηκε εξετάζοντας τις παραμέτρους απόδοσης και τους συντελεστές συγκράτησης, για κάθε συνδυασμό πειραμάτων. Από πλευράς υλικού κατασκευής, επιλέχθηκε η μεμβράνη της πολυσουλφόνης ως η πιο κατάλληλη καθότι παρουσίασε ικανοποιητικές τιμές συντελεστών συγκράτησης και παραμέτρων απόδοσης, όταν η συγκέντρωση των β-γλυκανών ήταν χαμηλότερη των 600 mg/L. Έπειτα, η μεμβράνη της πολυσουλφόνης εφαρμόστηκε σε μία πιλοτική μονάδα εφαπτομενικής ροής αντί του κελιού κάθετης ροής. Παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση τόσο στη συγκράτηση των βγλυκανών όσο και στην ανάκτηση ροής, χωρίς αισθητή μείωση της πυκνότητας ροής του διηθήματος. Εν τέλει, η μεμβράνη της πολυσουλφόνης εφαρμόστηκε στην πιλοτική μονάδα εφαπτομενικής ροής για την υπερδιήθηση των περιεχόμενων β-γλυκανών (<600 mg/L) στα διαλύματα τροφοδοσίας, τα οποία ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επέδειξαν ότι η βελτιστοποιημένη διεργασία της υπερδιήθησης (μεμβράνη πολυσουλφόνης στη μονάδα εφαπτομενικής ροής, με τιμή δια-μεμβρανικής πίεσης 2 bar και συγκεντρώσεις β-γλυκανών<600 mg/L) θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την ανάκτηση των βγλυκανών από τα διαλύματα τροφοδοσίας (που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης), αλλά και για το διαχωρισμό τους από μικρότερες ουσίες οργανικής και ανόργανης προέλευσης. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα της παραπάνω εφαρμογής ήταν ο χαμηλός βαθμός διαχωρισμού μεταξύ β-γλυκανών και πρωτεϊνών.

Ο επιτυχής σχεδιασμός αλλά και η βελτιστοποίηση της γραμμής παραγωγής σε μία βιομηχανία τροφίμων βασισμένης σε ενζυμικές διεργασίες, απορρέει από την εφαρμογή ποικίλων μοντέλων πρόβλεψης. Γι' αυτό το σκοπό, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο βασισμένο στην εξίσωση Boltzmann,

ικανό να προσομοιάσει την τυχαία δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης στο μόριο του αμύλου, συσχετίζοντας την πολλαπλότητα υδρολύσεων (w) με το μέγεθος του υποστρώματος (s), ως προς τα τελικά αλλά και τα ενδιάμεσα προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου. Η σχέση τους αποδείχθηκε ότι ήταν λογαριθμική και στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανότητα εμφάνισης ενός συγκεκριμένου προϊόντος, της μαλτόζης. Τέλος, τα αποτελέσματα του μοντέλου συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα και διαπιστώθηκε ικανοποιητική προσέγγιση.

#### ABSTRACT

Oat-based products with desirable sensory properties contribute to the maintenance of human's nutritional health; their important nutritional attributes are related to diabetes and control of blood cholesterol levels. A Swedish company (OATLY AB) is applying a multienzymic system for the production of a non-dairy product, oatmilk. In terms of the current PhD thesis the company funded us in order to perform a research work aiming at the optimization of the production line followed in the industry. In particular, the enzyme hydrolysis kinetics were evaluated during enzymic hydrolysis of oat flour aqueous dispersions under varying conditions, with the maltose content being the response variable. The results obtained contribute to our understanding of amylase functionality and should allow for a better prediction of final product quality.

Oat flour samples from *Avena sativa* (and three fractions of it) were used and two industrial enzyme preparations,  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase, in three combinations. The enzyme hydrolysis kinetics of the oat flour dispersions were studied [10% solids (w/w), 60 °C] and the oligosaccharides produced (glucose, maltose, maltotriose and maltotetraose) were determined using the HPLC analytical method. Indeed, the flow behaviour and viscoelastic properties of the dispersions as well as the time dependence of viscosity changes during enzymic hydrolysis were performed. Color,  $\beta$ -glucan and total starch were some parameters that also were studied.

The results on the enzyme hydrolysis kinetics showed that maltose production mainly happened (60%) when the two amylases were both involved in the enzymic reaction, while the highest maltotriose content (25%) was observed under the action of the  $\alpha$ -amylase alone, in excess of glucose and maltotetraose. In rheological measurements, it had been shown that an extensive viscosity reduction during the enzymic hydrolysis, in particular of  $\alpha$ -amylase was observed. On the other hand,  $\beta$ -amylase had only minor impact on the rheological properties of the oat flour dispersions. The rheological behavior of all hydrolyzates is typical of pseudoplastic fluids. The mechanical spectra of all oat flour enzymic hydrolyzates revealed that the oat flour hydrolyzates displayed the typical viscoelastic behaviour of macromolecular dispersions, where G'' was larger than G' and both moduli increased with increasing frequency, whilst in most of the cases, the behavior approached that of solid-like materials at higher frequencies, i.e. the G' was greater than G''.

In a second part of the thesis, the ultrafiltration process of high molecular weight  $\beta$ -glucan molecules was investigated, with a final purpose to optimize their recovery from oat mill waste. Therefore, standard  $\beta$ -glucan solutions were processed in a dead-end cell using three types of membranes (regenerated cellulose, polyethersulfone and polysulfone) under several transmembrane pressures. Optimization conducted by monitoring performance parameters and retention coefficients for each experimental combination. In terms of membrane type, polysulfone was selected as the most appropriate membrane material since it obtained satisfactory retention coefficient and performance parameter values when the  $\beta$ -glucan concentration was less than 600 mg/L.

Thereafter, the polysulfone membrane was applied in a pilot cross-flow module instead of deadend cell. The retention of  $\beta$ -glucan as well as the flux recovery were markedly improved with no important reduction of the permeate flux. Finally, polysulfone membrane applied in the pilot cross-flow module for the ultrafiltration of  $\beta$ -glucan containing feeds (<600 mg/L) recovered from industrial oat mill waste. Results indicated that the optimized ultrafiltration process (polysulfone in cross-flow module, with transmembrane pressure $\leq 2$  bar and  $\beta$ -glucan concentrations <600 mg/L) could be utilized in order to recover  $\beta$ -glucan from the oat mill waste feeds and clarify them from smaller organic and inorganic compounds. A disadvantage of the latter application was the small degree of separation between  $\beta$ -glucans and proteins.

A thorough study of the mechanisms of starch hydrolysis as well as its mathematical modeling is required, in order to optimize the performance of the enterprises dealing with the subject of nondairy products. For this reason, an interactive scheme with a multi-step correlation between the theory and the experiment had been developed. Based on the Boltzmann equation, the model was capable of simulating the random action pattern of  $\alpha$ -amylase on starch molecule, by correlating the term *w* (the number of possible product mixtures after a given stage of hydrolysis) with the s (the size of the substrate molecule), in terms of the hydrolysis products. The relationship shown to be logarithmic and then, the probability of maltose production was examined. The results obtained from the model were in good agreement with the experimental results.

## ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ

Ο στόχος αλλά και η πρωτοτυπία της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορούν τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας στη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης, αλλά και την ορθή περιβαλλοντική συμπεριφορά της βιομηχανίας. Η καινοτομία της συγκεκριμένης διατριβής επικεντρώνεται στα εξής σημεία:

- Κινητική μελέτη της υδρόλυσης του αμύλου υπό συνθήκες ετερογενούς υδατικής διασποράς (60 °C/ διασπορά σωματιδίων).
- Προσομοίωση της γραμμής παραγωγής σε εργαστηριακή κλίμακα, σε συνδυασμό με την εφαρμογή ενός μαθηματικού μοντέλου -βασισμένου στην τροποποιημένη εξίσωση του Boltzmann-, ικανό να προβλέψει σε ικανοποιητικό βαθμό τα τελικά προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης, προσεγγίζοντας αρκετά την πραγματική εικόνα της παραγωγικής διαδικασίας στη βιομηχανία.
- Εξίσου καινοτόμο είναι και το τμήμα της διατριβής που αφορά την περιβαλλοντική διαχείριση του παραπροϊόντος της παραγωγικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, βελτιστοποίηση της διεργασίας της υπερδιήθησης με χρήση μεμβρανών ποικίλης προέλευσης, με στόχο την ανάκτηση αλλά και το διαχωρισμό των β-γλυκανών από το στερεό απόβλητο βρώμης. Απώτερος σκοπός είναι η επαναχρησιμοποίηση αυτών ως πρόσθετα συστατικά σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ПЕРІЛНҰН	iii
ABSTRACT	vi
ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ	. viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	. xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑ	XV
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	. xvi
Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΤΟ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟ ΤΗΣ ΒΡΩΜΗΣ	1
1.1. Δομή και μορφολογικά χαρακτηριστικά	1
1.2. Χημική σύσταση βρώμης	3
1.2.1. Υδατάνθρακες	3
1.2.1.1. Aunto	
1.2.1.2. Λιαιτητικές ίνες	7
1.2.3. Пронтеїнес	
$1.2.4. \Lambda i \pi n$	
1.2.5. Φαινολικές ενώσεις	13
1.2.6 <i>Βιταμίνες</i>	14
1.2.7 Τέφοα και μεταλλικά στοιχεία	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΔΥΣΗ ΑΜΥΔΟΥ	15
2.1. Εισανωνικά	15
2.2. Αμολολοτικά ένζομα	16
2.3. Παράνοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης	19
2.4. Ποραγοιτος που οπηροαξου τη οτασπαστα της στερματές συροποσης	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΒΡΟΜΗ – ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ	20
ΑΝΘΡΟΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ	23
31 Ποοϊόντα βοώμης	24
3.2. Διατροφικοί ισνυρισμοί νια τα προϊόντα βρώμης	26
3.3. Η ερερνετική δράση των διαιτητικών ινών	26
3.4. Οφέλη στην ανθοώπινη υνεία – Μηγανισμοί δράσης	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΛΙΗΘΗΣΗΣ ΣΤΑ ΑΓΡΟ-ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ	20
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΟΝ	31
41 Διερνασίες μεμβρανών ιδιότητες και μηνανισμοί	31
4? Τύποι μεμβοανών	32
43 Η διερνασία της υπερδιήθησης	34
4 4 Εφαρμονή των μεμβρανών υπερδιήθησης στα ανορ-βιρμηνανικά απόβλητα βιρμηνανιών	,, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
τοοφίμων	35
ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
ΣΧΕΛΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι	42
5.1. Υλικά	42
5.2. Υδρολυτικά ένζυμα	43
5.3 Ενζυμική υδοόλυση αλεύοου βοώμης	43
erer zregening oppriorit whoper proprist	15

5.4. Καθαρισμός των δειγμάτων (υδρολυμάτων) – Εκχύλιση των ολιγοσακχαριτών	44		
5.5. Προσδιορισμός Ολιγοσακχαριτών στα Υδρολύματα			
5.5.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	46		
5.5.2. Ανάλυση με χρήση ενζυμικού κυτίου γλυκόζης	47		
5.6. Ρεολογικές ιδιότητες	47		
5.7. Προσδιορισμός χρώματος	49		
5.8. Προσδιορισμός β-γλυκανών	49		
5.9. Προσδιορισμός ολικού αμύλου	51		
5.10. Στατιστική ανάλυση	52		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΙΙ	53		
6.1. Υλικά	53		
6.2. Μέθοδοι	55		
6.2.1. Αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης	55		
6.2.2. Πιλοτική μονάδα μεμβρανών υπερδιήθησης	57		
6.3. Προ-επεξεργασία του αποβλήτου και διαχωρισμός των συστατικών του με τη διεργασία τ	ωv		
μεμβρανών	59		
6.3.1. Μελέτη εκχύλισης των β-γλυκανών από το απόβλητο	59		
6.3.2. Προ-επεξεργασία των μεμβρανών	59		
6.3.3. Πειράματα διαχωρισμού των συστατικών του αποβλήτου με τη διεργασία των			
μεμβρανών	60		
6.4. Παρασκευή πρότυπου διαλύματος β-γλυκάνης & εφαρμογή διεργασίας των μεμβρανών	61		
6.5. Αναλύσεις	62		
6.5.1. Προσδιορισμός υγρασίας	62		
6.5.2. Προσδιορισμός β-γλυκανών	62		
6.5.3. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων	63		
6.5.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών	63		
6.5.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολών	65		
6.5.6. Προσδιορισμός χημικώς απαιτούμενου οζυγόνου (COD)	65		
6.5.7. Προσδιορισμός pH, αγωγιμότητας	65		
6.5.8. Προσδιορισμός κατιόντων $K^+$ και $Na^+$	66		
6.5.9. Προσδιορισμός συντελεστών συγκράτησης	66		
6.6. Στατιστική ανάλυση	66		
ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ			
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ Ι	68		
7.1. Κινητικές ενζυμικής υδρόλυσης - Προκαταρκτικά πειράματα	68		
7.2. Μελέτη των κινητικών της ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης (Προσδιορισμός το	DV		
ολιγοσακχαριτών με τη μέθοδο HPLC)	70		
7.3. Προσδιορισμοί χημικής σύστασης & χρώματος του υδατικού αιωρήματος βρώμης	77		
7.4. Επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης και της κλασματοποίησης στο ιζώδες	78		
7.5. Έλεγχος ύπαρξης υπολειμματικής β-γλυκανάσης στα βιομηχανικά ενζυμικά σκευάσματα (	(α-		
αμυλάση και β-αμυλάση)	80		
7.6. Ρεολογική συμπεριφορά των υδρολυμάτων αλεύρου βρώμης	81		
7.7. Επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινομενικό ιζώδες και μηχανικά φάσματα	82		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΙΙ	86		
8.1. Παρουσίαση αποτελεσμάτων	86		
8.1.1. Παράμετροι απόδοσης μεμβρανών που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτα	DV		
υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης	86		
8.1.2. Συντελεστές συγκράτησης στα πειράματα υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-			
γλυκάνης	88		

8.1.3. Χαρακτηρισμός των διαλυμάτων τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό	
απόβλητο βρώμης	89
8.1.4. Παράμετροι απόδοσης που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια πειραμάτων υπερδιήθη	σης για
τα διαλύματα που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης	91
8.1.5. Συντελεστές συγκράτησης στα πειράματα υπερδιήθησης για τα διαλύματα τροφοδο	σίας
που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης	92
8.2. Σχολιασμός των Αποτελεσμάτων	93
8.2.1. Επεξεργασία των β-γλυκανών με μεμβράνες υπερδιήθησης διαφερετικού τύπου	93
8.2.2. Επεξεργασία των β-γλυκανών στο σύστημα υπερδιήθησης κάθετης ροής σε σύγκρι	ση με
το σύστημα υπερδιήθησης εφαπτομενικής ροής	
8.2.3. Εφαρμογή της διεργασίας της υπερδιήθησης στις β-γλυκάνες που προέρχονταν απο	ό το
στερεό απόβλητο βρώμης	98
ΙΥ. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 - ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΜΕ ΤΗΝ α-	
ΑΜΥΛΑΣΗ	102
9.1. Εισαγωγή	102
9.2. Μοντέλο προσομοίωσης του μηχανισμού ενζυμικής υδρόλυσης αμυλόζης & αμύλου	102
9.3. Παραδοχές για το "συμμετρικό μοντέλο"	103
9.4. Ανάπτυξη του μοντέλου	106
9.5. Συμβολισμοί	107
9.6. Προσέγγιση Boltzmann	112
9.7. Γραμμικοποίηση	113
9.8. Συσχέτιση "συμμετρικού" και "πραγματικού" μοντέλου	114
9.9. Προσδιορισμός μαλτόζης	117
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ &amp; ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ</b>	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	121
10.1. Συμπεράσματα διατριβής	121
10.2. Προοπτικές έρευνας	125
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	126
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127
Διεθνής βιβλιογραφία	127
Ελληνική βιβιογραφία	144

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Χημική σύσταση (τυπικό εύρος) του σπόρου της βρώμης3
Πίνακας 6.1. Χημική σύσταση του στερεού αποβλήτου (Adavena F30)53
Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά των μεμβρανών και συνθήκες λειτουργίας αυτών
Πίνακας 7.1. Προσδιορισμός β-γλυκανών και ολικού αμύλου για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου
βρώμης (και τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα), και βαθμού υδρόλυσης από την συνδυασμένη δράση της α-
αμυλάσης και της β-αμυλάσης
<b>Πίνακας 7.2.</b> Ανάλυση χρώματος για τα υπερκείμενα στρώματα (10min σε 615 × g) των υδρολυμάτων78
Πίνακας 8.1. Παράμετροι απόδοσης μεμβράνης που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων
υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης
Πίνακας 8.2. Συντελεστές συγκράτησης για τα πειράματα υπερδιήθησης, κατά την εφαρμογή των
πρότυπων διαλυμάτων β-γλυκάνης
Πίνακας 8.3. Χαρακτηριστικά των διαλυμάτων τροφοδοσίας, τα οποία ανακτήθηκαν από το στερεό
απόβλητο βρώμης90
Πίνακας 8.4. Παράμετροι απόδοσης που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα
διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης. Τα πειράματα
πραγματοποιήθηκαν με τη μεμβράνη πολυσουλφόνης (PS) στο σύστημα εφαπτομενικής
ροής91
Πίνακας 8.5. Συντελεστές συγκράτησης που υπολογίστηκαν για διάφορες παραμέτρους, κατά την
εφαρμογή των διαλυμάτων τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβητο βρώμης. Τα πειράματα
διεξήχθησαν με μεμβράνη πολυσουλφόνης (PS) στο σύστημα εφαπτομενικής ροής, εφαρμόζοντας τη
βέλτιστη δια-μεμβρανική πίεση των 2 bar92
<b>Πίνακας 9.1.</b> Πολλαπλότητα υδρολύσεων (w) των <i>n</i> -μερών (για 5≤ <i>n</i> ≤14) για τα διάφορα στάδια της
υδρόλυσης, στην περίπτωση του "συμμετρικού" μοντέλου114
<b>Πίνακας 9.2.</b> Πολλαπλότητα υδρολύσεων (w) των <i>n</i> -μερών (για 5≤ <i>n</i> ≤14) για τα διάφορα στάδια της
υδρόλυσης, στην περίπτωση του "πραγματικού μοντέλου"
Πίνακας 9.3. Ποσοστά εμφάνισης της μαλτόζης στα τελικά προϊόντα, και αναλογία της μαλτόζης σε σχέση
με το σύνολο των παραγόμενων προϊόντων, για το "συμμετρικό" και "πραγματικό" μοντέλο (για ένα εύρος
υποστρωμάτων μεγέθους s)

# $KATA\Lambda O \Gamma O \Sigma \Sigma XHMAT \Omega N$

Σχήμα 1.1. Δομή του δημητριακού σπόρου της βρώμης1
Σχήμα 1.2. Δομή του αμύλου
Σχήμα 1.3. Δομή αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης6
Σχήμα 1.4. Σύγκριση περιεκτικότητας (%) σε β-γλυκάνες μεταξύ κάποιων δημητριακών9
Σχήμα 1.5. Μοριακή δομή β-γλυκάνης9
Σχήμα 1.6. Ποσοστά ελεύθερων λιπαρών (%) σε διάφορα δημητριακά12
Σχήμα 4.1. Σύστημα μεμβρανών πλακών και πλαισίων (plate and frame)
Σχήμα 4.2. Παρουσίαση των σταδίων που ακολουθούνται στη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης,
με χρήση του λογισμικού προγράμματος SuperPro Designer <sup>®</sup>
Σχήμα 5.1. Καθαρισμός των υδρολυμάτων και εκχύλιση των ολιγοσακχαριτών
Σχήμα 6.1. Χημικές δομικές μονάδες των υλικών παρασκευής των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν
(RC, PES & PS), και της β-γλυκάνης
Σχήμα 6.2. Αναπαράσταση της λειτουργίας του αναδευόμενου κελιού υπερδιήθησης
Σχήμα 6.3. Αναπαράσταση λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας μεμβρανών υπερδιήθησης58
Σχήμα 7.1. Κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης με τι
δράση των αμυλασών, σε τρεις συνδυασμούς (χρήση ενζυμικού κυτίου γλυκόζης)
Σχήμα 7.2. Σύγκριση των αποτελεσμάτων ενζυμικής υδρόλυσης ως προς τα ποσοστά παραγόμενης
μαλτόζης, με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης (α-αμυλάση:β-αμυλάση 1:20).
Σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης: του ενζυματικού κυτίου γλυκόζης και της HPLC
αναλυτικής μεθόδου
Σχήμα 7.3. Τυπικό (HPLC-RI) χρωματογράφημα ολιγοσακχαριτών, μετά από 1 ώρα υδρόλυσης του
υδατικού αιωρήματος βρώμης με το ένζυμο της α-αμυλάσης71
Σχήμα 7.4. Κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης με τη
δράση των ενζύμων της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης, σε τρεις συνδυασμούς (HPLC μέθοδος)72
Σχήμα 7.5. Υδρόλυση αλεύρου βρώμης σε δύο στάδια, με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και
β-αμυλάσης
Σχήμα 7.6. Διαδοχική ενζυμική υδρόλυση αλεύρου βρώμης, με τη διαδοχική δράση της α-αμυλάσης και
της β-αμυλάσης
Σχήμα 7.7. Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων παραγόμενης (α) μαλτόζης, και (β) μαλτοτριόζης, κατά τη
διάρκεια υδρόλυσης του συνολικού άλευρου βρώμης και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων, με τη
συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης
Σχήμα 7.8. Σύγκριση του ιξώδους κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, με το ένζυμο της α-αμυλάσης (μόνη
της), της β-αμυλάσης (μόνη της) & της συνδυασμένης δράσης των δύο αμυλασών
Σχήμα 7.9. Σύγκριση του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης του συνολικού αλεύρου
και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων, με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και της β-

αμυλάσης
Σχήμα 7.10. Το ιξώδες κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης ενός διαλύματος καθαρής β-γλυκάνης
συγκέντρωσης 1% (w/w), με τη δράση των ενζύμων της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης – Έλεγχος της
πιθανής παρουσίας της υπολειμματικής ενεργότητας της β-γλυκανάσης στα βιομηχανικά σκευάσματα
των δύο αμυλασών
Σχήμα 7.11. Φαινομενικό ιξώδες σε ένα εύρος ρυθμού διάτμησης (25 °C) των ενζυμικών υδρολυμάτων:
α-αμυλάση (4,16 FAU) και β-αμυλάση (57°L) σε 200 ml υδατικού αιωρήματος βρώμης, σε συγκέντρωση
10% (w/w), για το συνολικό άλευρο βρώμης και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα82
Σχήμα 7.12. Επίδραση της θερμοκρασίας στο ιξώδες των ενζυμικών υδρολυμάτων: α-αμυλάση (4,16
FAU) και β-αμυλάση (57°L) σε 200 ml υδατικού αιωρήματος βρώμης, σε συγκέντρωση ίση με 10%
(w/w), για: (a) το συνολικό άλευρο βρώμης, και (β) το κοκκομετρικό κλάσμα αλεύρου βρώμης με
μέγεθος μορίων>500μm, και το διάγραμμα Arrhenius για το ιξώδες (σε 10 s <sup>-1</sup> ) έναντι της θερμοκρασίας
(εσωτερικό σχήμα)
<b>Σχήμα 7.13.</b> Μηχανικά φάσματα ( $\gamma = 0,1\%, 25^{\circ}$ C) των ενζυμικών υδρολυμάτων, για το συνολικό άλευρο
βρώμης και τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα αυτού
Σχήμα 9.1. Σχηματική αναπαράσταση της πλήρους υδρόλυσης ενός 10-μερούς ευθύγραμμου
μορίου105
Σχήμα 9.2. Σχηματική αναπαράσταση δύο φάσεων της υδρόλυσης του 13-μερούς111
Σχήμα 9.3. Συσχέτιση του lnw κάθε φάσης υδρόλυσης (α) w1, (β) w2, (γ) w3, (δ) w4, με το αντίστοιχο
<i>s</i> 112
Σχήμα 9.4. Γραμμικοποιημένο διάγραμμα μεγέθους-πολλαπλότητας υδρολύσεων για το "συμμετρικό"
μοντέλο
Σχήμα 9.5. Συσχέτιση του "συμμετρικού" με το "πραγματικό" μοντέλο, σε επίπεδο αριθμού υδρολύσεων
(multiplicity, w)115
Σχήμα 9.6. Γραμμικοποιημένη σχέση μεγέθους-πολλαπλότητητας για το "πραγματικό" μοντέλο116
Σχήμα 9.7. Απλοποιημένη μορφή της γεωμετρίας του μορίου της αμυλοπηκτίνης, όπου κάθε
διακλάδωση παρουσιάζεται ως άθροισμα τριών γραμμικών αλυσίδων γλυκόζης

# ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑ

MB	Μοριακό Βάρος	
LDL	Χαμηλής-Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη	
HDL	Υψηλής-Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη	
CVD	Καρδιαγγειακές Παθήσεις	
MWCO	Τιμή "Μοριακού Κατωφλιού" (Molecular Weight Cut Off)	
RC	Αναγεννημένη Κυτταρίνη	
PS	Πολυσουλφόνη	
PES	Πολυαιθεροσουλφόνη	
UF	Υπερδιήθηση	
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	
G	Συνιστώσα Ελαστικότητας	
G″	Ιξώδης Συνιστώσα	
ТМР	Δια-μεμβρανική Πίεση	
RF	Σχετική Ροή	
L	Διαπερατότητα	
J	Πυκνότητα Ροής	
FR	Ανάκτηση Ροής	
COD	Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο	
R%	Συντελεστής Συγκράτησης	
W	Πολλαπλότητα Υδρολύσεων	
S	Μέγεθος Υποστρώματος (ανά μονάδα γλυκόζης)	

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων ανά τον κόσμο υποφέρουν από υψηλά ποσοστά χοληστερόλης, υπερβολικό βάρος καθώς και χρόνιες παθήσεις όπως διαβήτης, αρτηριοσκλήρυνση και διατροφικές δυσλειτουργίες, γι'αυτό και παρατηρείται στις μέρες μας μία συνεχώς αυζανόμενη τάση προς μια περισσότερο ισορροπημένη, υγιεινή διατροφή. Τα δημητριακά αποτελούν σημαντικές πηγές πρωτεϊνών, υδατανθράκων (συμπεριλαμβανομένων και των διαιτητικών ινών), συμπλόκων βιταμίνης Β και βιταμίνης Ε. Η βρώμη παρουσιάζει μία ισορροπία ανάμεσα στις θρεπτικές ουσίες, τα λίπη, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες, τα οποία και προσαρμόζονται τέλεια στις ανθρώπινες ανάγκες, όπως επίσης και παρέχει ένα σημαντικό ποσοστό σε διαλυτές ίνες, τις β-γλυκάνες, οι οποίες έχει αποδειχθεί πως συντελούν στη μείωση της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό (Lazaridou et al., 2007). Όλα τα παραπάνω ενίσχυσαν την ιδέα παραγωγής ενός προϊόντος από βρώμη, το γάλα βρώμης (Lindahl et al., 1997). Το βασικό πλεονέκτημά του σε σχέση με το κοινό γάλα (ζωικής προέλευσης) είναι ότι περιέχει στο μόριό του μαλτόζη αντί λακτόζης, δεδομένης της πιθανής δυσανεξίας στη λακτόζη.

Στη βρώμη, όπως και στα υπόλοιπα δημητριακά, ο πιο σπουδαίος υδατάνθρακας είναι το άμυλο. Πολλά προϊόντα μπορούν να παραχθούν τροποποιώντας ενζυμικά το άμυλο βρώμης, μεταξύ των οποίων και το γάλα βρώμης. Ωστόσο, δεδομένου ότι το ζελατινοποιημένο άμυλο είναι επιδεκτικό στην ενζυμική δράση, στις περισσότερες των περιπτώσεων η ενζυματική τροποποίηση του αμύλου πραγματοποιείται πάνω σε ένα ζελατινοποιημένο πολτό. Τα πλέον διαδεδομένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου είναι οι αμυλάσες, με έμφαση στην α-αμυλάση (ενδο-ένζυμο) και στη β-αμυλάση (εξω-ένζυμο), που υδρολύουν τους α-(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς των πολυμερών του αμύλου. Μια άλλη ομάδα ενζύμων καταλύει τους α-(1→6) γλυκοζιτικούς δεσμούς, με χαρακτηριστικό το ένζυμο της πουλουλανάσης.

Πέραν των ποικίλων διατροφικών πλεονεκτημάτων που προσφέρουν τα "λειτουργικά προϊόντα" τροφίμων, κάθε διεργασία που ακολουθείται κατά την παραγωγή τους στη βιομηχανία συνοδεύεται και από την παραγωγή ενός αποβλήτου. Συγκεκριμένα, τα απόβλητα των βιομηχανιών δημητριακών περιέχουν ένα μικρό ποσοστό φυτικών ινών που έχουν ευεργετική δράση στην ανθρώπινη υγεία, όπως για παράδειγμα οι β-γλυκάνες. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αυξημένη τάση ανάκτησης συστατικών ανώτερης θρεπτικής αξίας από τα απόβλητα, με στόχο την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα τροφίμων με υψηλή προστιθέμενη αξία

(Faulds et al., 1997, Laufenberg et al., 2003), αλλά ταυτόχρονα και την ορθότερη περιβαλλοντική διαχείριση των αποβλήτων.

# Ι. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΤΟ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΟ ΤΗΣ ΒΡΩΜΗΣ

#### 1.1. Δομή και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η βρώμη, μέλος της οικογένειας Gramineae, περιλαμβάνει διάφορα είδη, όπως: Avena abyssinica, A.byzantina, A.fatua, A.nuda, A.sativa, A.strigosa, εκ των οποίων τα είδη A.sativa και A.byzantina καλλιεργούνται σε μεγαλύτερο βαθμό παγκοσμίως (Schrickel, 1986). Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της βρώμης έχει επεκταθεί σημαντικά, με πρώτη χώρα τη Ρωσία ως προς την ετήσια παραγωγή (5834910 MT/year). Ακολουθούν η Πολωνία και η Φιλανδία, ενώ η Σουηδία έρχεται στην έβδομη θέση (820000 MT/year). Σε σχέση με διάφορες πηγές αμύλου, η βρώμη έρχεται πέμπτη σε σειρά όσον αφορά την παραγωγή, μετά το σιτάρι, το ζαχαρότευτλο, το κριθάρι και την πατάτα, στη χώρα της Σουηδίας (FAO, 2008). Η αυξημένη καλλιέργεια του δημητριακού της βρώμης οφείλεται στο χονδρό, ογκώδες λέπυρό της, και στη μέγιστη θρεπτική αξία του πολύπλοκου σπόρου της, στοιχεία τα οποία προσδίδουν εξαιρετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά σε προϊόντα τροφίμων (Burrows, 1986). Πιο συγκεκριμένα, ο δημητριακός σπόρος της βρώμης αποτελείται από τα εξής δομικά χαρακτηριστικά: το λέπυρο, το εξωτερικό πίτυρο, το εσωτερικό αμυλώδες ενδοσπέρμιο και το φύτρο (Σχήμα 1.1.).



Σχήμα 1.1. Δομή του δημητριακού σπόρου της βρώμης

Το λέπυρο αποτελεί το 25-30% του ξηρού βάρους του σπόρου και συνήθως διατηρείται στο σπόρο και μετά τη συγκομιδή του. Πρόκειται για μια φυλλώδη δομή που περικλείει σφιγτά τον σπόρο αποτελούμενη κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και πρωτεΐνη (Fulcher R.G., 1986). Κατόπιν της απομάκρυνσης του εξωτερικού λέπυρου, ο δημητριακός σπόρος της βρώμης διαφέρει από τα υπόλοιπα δημητριακά ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά και τη χημική του σύσταση. Έχει ελλειπτικό σχήμα (Webster, 2002) και συνήθως είναι πιο μακρύς, λεπτός και περισσότερο κυλινδρικός συγκρινόμενος με το σπόρο του σιταριού και εκείνο του κριθαριού. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη σε συνδυασμό με την απαλή υφή, καθιστούν δύσκολο τον διαχωρισμό στα τρία βασικά δομικά χαρακτηριστικά του: το πίτυρο, το ενδοσπέρμιο και το φύτρο (Fulcher, 1986). Παρότι το αμυλώδες ενδοσπέρμιο αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του σπόρου (55-70%) (Webster, 2002), τα ιδιαίτερα ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της βρώμης οφείλονται στο πίτυρο, το οποίο είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες. Ωστόσο, τα λεπτά του στρώματα είναι ιδιαίτερα σκληρά και δύσπεπτα, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε λιγνίνη και φαινολικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, καθοριστικής σημασίας για τη βρώμη είναι η παρουσία των β- $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)$ -D-γλυκανών (ή "β-γλυκανών"). Μπορεί να απαντώνται σε μικρότερο βαθμό στο πίτυρο απ' ότι στο αμυλώδες ενδοσπέρμιο, αλλά η παρουσία τους ενισχύει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης νερού του πιτύρου, και κατ' επέκταση την λειτουργικότητά τους ως διαιτητικές ίνες (Fulcher, 1986).

Το ενδοσπέρμιο αποτελεί τον κύριο αποθηκευτικό ιστό με κύτταρα γεμάτα αμυλόκοκκους κατά κύριο λόγο, καθώς επίσης και πρωτεΐνες, λίπη και β-γλυκάνες. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη και β-γλυκάνες στο ενδοσπέρμιο διαφοροποιεί τη βρώμη από τα υπόλοιπα δημητριακά (Webster, 2002). Ένα κυτταρικό στρώμα περιβάλλει το ενδοσπέρμιο καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα του φύτρου, η στοιβάδα της "αλευρώνης", η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο κατά τη βλάστηση. Παράγει και εκκρίνει υδρολυτικά ένζυμα τα οποία αποικοδομούν το αμυλώδες ενδοσπέρμιο και έτσι βοηθούν στη μεταφορά διαλυτών θρεπτικών συστατικών στο φύτρο. Τα κυτταρικά τοιχώματα της "αλευρώνης" είναι πλούσια σε β-γλυκάνες και φαινολικές ενώσεις (Fulcher, 1986, Webster, 2002). Το φύτρο αποτελεί ένα πολύ μικρό τμήμα του σπόρου της βρώμης (2,8-3,7%) με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (30-35%). Ωστόσο, η απαλή υφή του σπόρου της βρώμης σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες τεχνικές άλεσης, καθιστούν δύσκολο τον διαχωρισμό και την απομόνωση του φύτρου από τα υπόλοιπα κλάσματα (Webster, 2002).

#### 1.2. Χημική σύσταση βρώμης

Η χημική σύσταση της βρώμης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος αυτού του αγροστώδους, τις συνθήκες συγκομιδής και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή της καλλιέργειας (Burrows, 1986). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι σημαντικό ρόλο παίζουν και οι διαφορές στο γενετικό υλικό μεταξύ ποικιλιών βρώμης που καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε διαφορετικά μέρη ανά τον κόσμο (Webster, 2002). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1.) παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια εύρη τιμών των βασικών συστατικών που απαντούν στο δημητριακό σπόρο της βρώμης, όπου φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση για κάθε συστατικό (εύρος συγκεντρώσεων).

	5, , , , , ,
	Σύσταση (%) του δημητριακού σπόρου
	της βρώμης (εύρος τιμών)
Πρωτεΐνες	15-20
Άμυλο	43-61
Λίπος	5-9
β-γλυκάνες	2,2-7,8
Νερό	9-14
Ελεύθερα σάκχαρα	0,9-1,3
Τέφρα & μεταλλικά στοιχεία	1,3-2,3

**Πίνακας 1.1.** Χημική σύσταση (τυπικό εύρος) του σπόρου της βρώμης (Webster, 2002, Lambo-Fodje, 2006, Lazaridou et al., 2007)

Στη συνέχεια της παραγράφου ακολουθεί λεπτομερής αναφορά στα βασικά συστατικά του δημητριακού σπόρου της βρώμης, με έμφαση στα ιδιαίτερα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους.

#### 1.2.1. <u>Υδατάνθρακες</u>

Ο σπόρος της βρώμης περιέχει χαμηλά ποσοστά ολικών και ελεύθερων υδατανθράκων σε σύγκριση με άλλα δημητριακά, τα οποία απαντούν σε όλα τα δομικά τμήματα του σπόρου (MacArthur-Grant, 1986). Οι υδατάνθρακες μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες, περιλαμβάνοντας: το άμυλο, τους μη-αμυλούχους πολυμερικούς υδατάνθρακες, τα ελεύθερα σάκχαρα και τους ολιγοσακχαρίτες (Webster, 2002). Το άμυλο είναι ο πιο σημαντικός υδατάνθρακας, όπως και για όλα τα δημητριακά, για το οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά στη συνέχεια. Οι μη-αμυλούχοι υδατάνθρακες, εξ ορισμού, είναι δύσπεπτοι και αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα των ολικών διαιτητικών ινών, οι οποίες κατ' επέκταση διαχωρίζονται σε διαλυτές και αδιάλυτες. Οι διαιτητικές ίνες παίζουν έναν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη θρεπτική αξία των προϊόντων ολικής άλεσης, ειδικότερα στα προϊόντα που προέρχονται από τη βρώμη. Οι σημαντικότεροι μη-αμυλούχοι υδατάνθρακες της βρώμης είναι οι β-γλυκάνες, η κυτταρίνη και οι αραβινοξυλάνες (πεντοζάνες). Οι β-γλυκάνες, αποτελούν με διαφορά το σημαντικότερο συστατικό των διαλυτών ινών (90%) (Webster, 2002, Virkki et al., 2005). Πρόκειται για το περισσότερο "ωφέλιμο" συστατικό της βρώμης, για το οποίο θα μιλήσουμε αναλυτικότερα παρακάτω. Η γλυκόζη, η αραβινόζη και η ξυλόζη, είναι οι βασικότεροι ολιγοσακχαρίτες που συναντώνται στο κλάσμα των αδιάλυτων ινών. Ωστόσο, στο σύνολο των διαιτητικών ινών της βρώμης αξίζει να αναφερθεί και η ύπαρξη ενός συστατικό που δεν είναι υδατανθρακικής φύσης (αγλυκόνη), η λιγνίνη. Πρόκειται για ένα πολυμερές, αποτελούμενο από μονάδες φαινυλοπροπανίου (Webster, 2002). Ως προς την περιεκτικότητα της βρώμης σε ελεύθερα σάκχαρα, κυρίως έχουν αναφερθεί η σουκρόζη, η ραφινόζη, η γλυκόζη, η μαλτόζη, η γλουκοδιφρουκτόζη και οι φρουκτοζάνες (ΜαcArthur-Grant, 1986).

#### 1.2.1.1. Άμυλο

Το άμυλο απαντά στο μεγαλύτερο τμήμα του δημητριακού σπόρου της βρώμης, με το μεγαλύτερο τμήμα του να κατανέμεται στο ενδοσπέρμιο (Stevnebø et al., 2006). Οι αμυλόκοκκοι των δημητριακών καρπών έχουν ακανόνιστο σχήμα, συνήθως πολυεδρική διάταξη και το μέγεθός τους ποικίλει μεταξύ 3-10 μm (Tester et al., 2004b). Το άμυλο απαντά σε αφθονία στη φύση και αποτελεί σημαντική πηγή αποθηκευμένης ενέργειας στα δημητριακά και τα όσπρια, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα (Crabb & Mitchinson, 1997, Svihus et al., 2005), παρέχοντας το 70-80% των θερμίδων που καταναλώνονται ημερησίως από τον άνθρωπο (BeMiller & Whistler, 1996). Οι φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες του αμύλου της βρώμης ποικίλλουν ανάλογα με την καλλιέργεια και μπορούν να επηρεαστούν από κλιματικούς και γενοτυπικούς παράγοντες (Paton, 1986).

Δομικά, το άμυλο αποτελείται από μονάδες α-D-γλυκόζης, ενωμένες μεταξύ τους με α- $(1 \rightarrow 4)$ και α- $(1 \rightarrow 6)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς (Σχήμα 1.2.). Στο τέλος κάθε αλυσίδας πολυμερούς υπάρχει μια ελεύθερη αλδεϋδομάδα, η οποία αποτελεί το λεγόμενο "αναγωγικό άκρο" (Van der Maarel et al., 2002). Το άμυλο στη φυσική του κατάσταση αποτελείται από κρυσταλλικά και άμορφα τμήματα, με βασικότερο συστατικό του κρυσταλλικού τμήματος την αμυλοπηκτίνη, ένα έντονα διακλαδιζόμενο μόριο [περιέχει ~95% α-(1→4) και ~5% α-(1→6) δεσμούς] (Banks & Greenwood, 1975, BeMiller & Whistler, 1996, Oates, 1997, Tester et al., 2004a).



Σχήμα 1.2. Δομή του αμύλου

Η αμυλοπηκτίνη μαζί με την αμυλόζη αποτελούν τα κύρια δομικά πολυμερή του αμύλου (Σγήμα 1.3.), με περιεκτικότητες 72-82% και 18-33%, αντίστοιχα, ως προς το συνολικό άμυλο (Buléon et al., 1998). Η αμυλόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, αν και εμφανίζει κάποιες λίγες διακλαδώσεις στο μόριό της [περιέχει ~99% α- $(1 \rightarrow 4)$  και ~1% α- $(1 \rightarrow 6)$  δεσμούς] (Tester et al., 2004a). Οι αλυσίδες γλυκόζης στην αμυλόζη μπορεί να είναι είτε κοντές είτε μακριές, ωστόσο, τα σημεία διακλάδωσης απέχουν αρκετά μεταξύ τους προσδίδοντας στην αμυλόζη τις φυσικές ιδιότητες ενός γραμμικού πολυμερούς (BeMiller & Whistler, 1996). Ως προς τα μοριακά τους βάρη, η αμυλοπηκτίνη (~ $1 \times 10^{7}$ - $1 \times 10^{9}$ Da) ξεπερνά το μοριακό βάρος της αμυλόζης (~ $1 \times 10^{5}$ - $1 \times 10^{6}$ Da) (Banks & Greenwood, 1975, Oates, 1997). Η αμυλοπηκτίνη, ως το βασικότερο συστατικό της κρυσταλλικής περιοχής του αμύλου, αποτελεί "στήριγμα" του σκελετού της κρυσταλλικής δομής του μορίου του αμύλου (Buléon et al., 1998). Η δομή της είναι εξαιρετικά πολύπλοκη, και έχει αναφερθεί ότι οι αλυσίδες γλυκόζης παρουσιάζουν τη μορφή "συμπλέγματος", μία δομή η οποία γαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενα τμήματα, ταξινομημένα σε πυκνή στοιβάδα παράλληλων αλυσίδων α-γλουκάνης με τη μορφή διπλών ελίκων, αλλά και από ένα λιγότερο οργανωμένο τμήμα αλυσίδων, η δομή του οποίου χαρακτηρίζεται κυρίως από την ύπαρξη των  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) δεσμών (Oates, 1997). Περιλαμβάνει ένα αναγωγικό άκρο και αμέτρητα μη-αναγωγικά άκρα λόγω των πολλών διακλαδώσεων του μορίου της. Αντίθετα, η αμυλόζη, λόγω της γραμμικότητας του μορίου της περιλαμβάνει μόνο ένα μη-αναγωγικό και ένα αναγωγικό άκρο (Duedahl-Olesen et al., 2000). Η αμυλόζη συνήθως απαντά στις άμορφες περιοχές των αμυλόκοκκων, σε όλο το τμήμα του (Zhang & Oates, 1999), και μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με ποικιλία από υποκαταστάτες (Cui & Oates, 1999). Ωστόσο, η παρουσία της αμυλόζης έχει αναφερθεί και στα κρυσταλλικά τμήματα των αμυλόκοκκων (Oates, 1997).



Σχήμα 1.3. Δομή αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης

Εκτός από την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη, έχει εντοπιστεί και η ύπαρξη ενδιάμεσης μοριακής δομής πολυμερών στο άμυλο, με συμπεριφορά όμοια με εκείνη της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης. Ο τύπος και η περιεκτικότητα του ενδιάμεσου κλάσματος ποικίλλει σημαντικά, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα του αμύλου σε αμυλόζη (Banks and Greenwood, 1975).

Δεδομένης της μοριακής ανομοιογένειας του αμύλου -ως κύριος αποθησαυριστικός ενεργειακά πολυσακχαρίτης των δημητριακών σπόρων- κρίνεται απαραίτητο να καθοριστεί ο χαρακτήρας και η συμπεριφορά των δύο βασικών πολυμερών του, της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης (ποικιλία στην περιεκτικότητά τους στο άμυλο, καθώς και στις δομές και ιδιότητές τους), καθώς

επιδρούν σημαντικά στις ιδιότητες και στη λειτουργικότητα του αμύλου (Buléon et al., 1998). Για παράδειγμα, η αμυλοπηκτίνη σε διάλυμα (αφού απομονωθεί), παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με την αμυλόζη (Martin & Smith, 1995). Αντίθετα, η αμυλόζη ακόμη και σε πολύ αραιά διαλύματα (1% ή και σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις) παρουσιάζει μεγάλη αστάθεια στο νερό παρουσιάζοντας φαινόμενα διαχωρισμού φάσεων αλλά και υψηλότερα ιξώδη στην περίπτωση σχηματισμού πηκτώματος (Zobel et al., 1988). Σε γενικές γραμμές, οι ιδιότητες των δύο δομικών συστατικών του αμύλου παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο· γι' αυτό οφείλουμε να έχουμε μια γενική ιδέα για το πώς η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη καθορίζουν την "αρχιτεκτονική" ή την εσωτερική δομή των αμυλόκοκκων, και κατά συνέπεια τη λειτουργικότητα του αμύλου σε προϊόντα τροφίμων (Thomas & Atwell, 1999). Διότι η γνώση της εσωτερικής δομής των αμυλόκοκκων αποτελεί κλειδί στην κατανόηση κάποιων κύριων μηχανισμών που ρυθμίζουν την υδρόλυσή τους από τις αμυλάσες (Tester & Karkalas, 2006). Εναλλακτικά, η μελέτη της ενζυμικής αμυλόλυσης αποτελεί μία οδό ως προς την κατανόηση της δομής των μορίων του αμύλου αλλά και της δομικής συγκρότησης των αμυλόκοκκων (Buléon et al., 1998).

#### 1.2.1.2. Διαιτητικές ίνες

Ο ορισμός της έννοιας "διαιτητική ίνα" έχει αποτελέσει σημαντικό θέμα συζήτησης από πολλούς επιστήμονες για πολλές δεκαετίες, ώσπου πρόσφατα οι Philips και Cui (2011) αναφέρουν τον πιο εξελιγμένο και διορθωμένο ορισμό, ο οποίος εγκρίθηκε τον Ιούνιο του 2009 από δύο παγκόσμιους οργανισμούς, τον Οργανισμό Γεωργίας και Τροφίμων και τον Οργανισμό Παγκόσμιας Υγείας (FAO/WHO, 2009). Ο ορισμός έχει ως εξής: "Ως διαιτητικές ίνες ορίζονται τα πολυμερή των υδατανθράκων που περιλαμβάνουν 10 ή περισσότερες μονάδες μονομερών στο μόριό τους, δεν μπορούν να υδρολυθούν από ενδογενή ένζυμα που περιέχονται στο λεπτό έντερο του ανθρώπου, και ανήκουν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Βρώσιμα πολυμερή υδατανθράκων που ευρίσκονται εκ φύσεως στα υπό κατανάλωση τρόφιμα
- Πολυμερή υδατανθράκων τα οποία έχουν προέλθει από τις πρώτες ύλες των τροφίμων μέσω φυσικών, ενζυμικών ή χημικών διεργασιών, και έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν λειτουργικά οφέλη στην υγεία και τα οποία έχουν γίνει επιστημονικά αποδεκτά από τις αρμόδιες αρχές

 Συνθετικά πολυμερή υδατανθράκων, τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν λειτουργικά οφέλη στην υγεία και που έχουν γίνει επιστημονικά αποδεκτό από τις αρμόδιες αρχές

Δύο υποσημειώσεις του ορισμού περιλαμβάνουν: (α) τη λιγνίνη και άλλα συστατικά, εάν σχετίζονται με τα κυτταρικά τοιχώματα των πολυσακχαριτών τα οποία δύνανται να προσδιοριστούν με τη χρήση συγκεκριμένων αναλυτικών μεθόδων, και (β) υδατάνθρακες που αποτελούνται από 3 έως 9 μονάδες μονομερών, μόνο και μόνο αν το εγκρίνουν οι διεθνείς αρχές" (Philips & Cui, 2011).

Οι διαιτητικές ίνες μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης κάποιων ασθενειών όπως: το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης τύπου 2, η στεφανιαία νόσος και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις, η υπέρταση και κάποιοι τύποι καρκίνου. Επίσης επιδρούν σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση του κανονικού βάρους του σώματος καθώς και στην ελάττωση του βάρους (Jones, 2007). Κυρίως στις Σκανδιναβικές χώρες παρατηρείται αυξημένη κατανάλωση δημητριακών ολικής άλεσης, και συγκεκριμένα σίκαλης, κριθαριού, βρώμης, καθώς επίσης και αρτοσκευασμάτων ολικής άλεσης (πλούσια σε διαιτητικές ίνες), και δημητριακών τύπου μούσλι. Αντιθέτως, στις χώρες της νότιας Ευρώπης, στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις ΗΠΑ, οι διατροφικές συνήθειες διαφέρουν αρκετά (Jones, 2007). Τόσο οι διαιτητικές ίνες όσο και τα δημητριακά ολικής άλεσης συμβάλλουν σημαντικά στη διατήρηση ή/και στη μείωση του σωματικού βάρους, και πιο συγκεκριμένα: (1) παρέχουν την αίσθηση κορεσμού σε συνάρτηση με τη λήψη χαμηλού θερμιδικού περιεχόμενου γευμάτων, (2) μειώνουν την απορρόφηση μακροθρεπτικών συστατικών, και (3) επιβραδύνουν τον ρυθμό της πέψης του αμύλου (Jones, 2007).

#### <u>β-Γλυκάνες</u>

Η βρώμη μαζί με το κριθάρι, υπερέχουν με διαφορά ως προς το ποσοστό των β-γλυκανών σε σχέση με τα υπόλοιπα δημητριακά (Σχήμα 1.4.), οι οποίες απαντούν κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα του αμυλούχου ενδοσπερμίου και της στοιβάδας της αλευρώνης, σε ποσοστό 85%. Η συγκέντρωση β-γλυκανών στο δημητριακό σπόρο μπορεί να ποικίλει σημαντικά, καθώς επηρεάζεται από τον γενοτυπικό παράγοντα όπως επίσης και από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της καλλιέργειας. Ξηροθερμικές συνθήκες πριν τη συγκομιδή έχουν ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα β-γλυκάνης στο σπόρο της βρώμης, ενώ στις καλλιέργειες σε υγρά κλίματα συμβαίνει το αντίστροφο (Lazaridou et al., 2007).



**Σχήμα 1.4.** Σύγκριση περιεκτικότητας (%) σε β-γλυκάνες μεταξύ κάποιων δημητριακών (Lazaridou et al., 2007, Izydorczyk & Dexter, 2008).

Οι β-γλυκάνες είναι δομικοί πολυσακχαρίτες, και συγκεκριμένα, γραμμικοί μη-διακλαδιζόμενοι ομοπολυσακχαρίτες, αποτελούμενοι από μονάδες β-D-γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται με β- $(1 \rightarrow 3)$  και β- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμούς (Wood P.J., 1986) (Σχήμα 1.5.).



Σχήμα 1.5. Μοριακή δομή β-γλυκάνης

Παρατηρώντας τη δομή της β-γλυκάνης, διαδοχικές μονάδες β-D-γλυκόζης ενωμένες με  $(1 \rightarrow 4)$ δεσμούς διακόπτονται ανά τριμερή ή ανά τετραμερή (συνήθως) από τον  $(1 \rightarrow 3)$ -δεσμό (Lazaridou et al., 2007). Στις β-γλυκάνες, η αναλογία των μονάδων τριμερών προς τετραμερή ποικίλει ανάλογα με το είδος του δημητριακού (Tosh, 2007). Πιο συγκεκριμένα, για τη βρώμη, το ποσοστό τριμερών (DP3) κυμαίνεται μεταξύ 53-61%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό τετραμερών (DP4), κυμαίνεται μεταξύ 43-41%. Η αναλογία των μονάδων τριμερών προς τετραμερή (DP3/DP4) αποτελεί στοιχείο καθοριστικής σημασίας για τη δομή των β-γλυκανών, και για τις β-γλυκάνες της βρώμης έχει βρεθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 1,5-2,3. Γενικότερα, οι β-γλυκάνες παρουσιάζουν ποικιλία ως προς τα μοριακά και δομικά χαρακτηριστικά τους, όπως το μοριακό τους βάρος, την αναλογία των β-(1 $\rightarrow$ 3)/-(1 $\rightarrow$ 4) δεσμών, καθώς και ως προς τα ποσοστά μεγαλύτερων κυτταρινικών ολιγομερών, πέρα απ' τα τριμερή και τετραμερή που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Το μοριακό βάρος των β-γλυκανών της βρώμης κυμαίνεται μεταξύ 35-3100×10<sup>3</sup>, και το μεγάλο αυτό εύρος οφείλεται στην επίδραση παραγόντων όπως: η ποικιλία, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (ανάπτυξης του δημητριακού), καθώς επίσης και οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Τόσο τα δομικά όσο και τα μοριακά χαρακτηριστικά επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικές ιδιότητες των β-γλυκανών, όπως τη διαλυτότητα στο νερό, τη διασπορά, το ιξώδες, τις ιδιότητες πηκτωματοποίησης, ενώ παράλληλα καθορίζουν και τη φυσιολογική τους δράση στον γαστρεντερικό σωλήνα. Σε γενικές γραμμές, όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθορίζουν τη διαλυτότητα των β-γλυκανών στο νερό, όπως επίσης και την εκχυλισιμότητά τους (Lazaridou et al., 2007).

Η εκχυλισιμότητα των β-γλυκανών έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Wood et al., 1977, Wood et al., 1991, Saulnier et al., 1994). Συνήθως δεν δύναται να επιτευχθεί πλήρης εκχύλιση των β-γλυκανών κάτω από ήπιες συνθήκες υδατικής εκχύλισης. Η εκχυλισιμότητα των β-γλυκανών επηρεάζεται από τις συνθήκες εκχύλισης (εκχυλιστικό μέσο, pH, θερμοκρασία, χρονική διάρκεια εκχύλισης, αναλογία στερεού-υγρού), την προ-επεξεργασία που έχουν υποστεί οι β-γλυκάνες (θέρμανση και ξήρανση), καθώς και από την παρουσία υδρολυτικών ενζύμων (ενδογενών ή μη-ενδογενών). Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και η άλεση, καθώς και το μέγεθος του κοκκομετρικού κλάσματος του αλεύρου. Για παράδειγμα, οι υψηλές θερμοκρασίες κατά την εκχύλιση σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του κοκκομετρικού κλάσματος αυξάνουν την εκχυλισιμότητα των β-γλυκανών. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες εκχύλισης (38 °C), το ποσοστό των διαλυτών β-γλυκανών (% w/w των ολικών β-γλυκανών) που εκχυλίστηκαν από τη βρώμη κυμαινόταν μεταξύ 65-90 %. Η παρουσία ενός αλκαλικού διαλύτη αντί του νερού, επίσης αυξάνει το ποσοστό εκχύλισης των β-γλυκανών (Lazaridou et al., 2007).

Οι β-γλυκάνες χαρακτηρίζονται ως διαιτητικές ίνες διότι το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα δεν δύναται να τις διασπάσει ή να τις αφομοιώσει, λόγω έλλειψης των κατάλληλων ενζύμων. Μόνο στο παχύ έντερο μπορεί αυτό να γίνει, όπου σε κάποιο βαθμό αποικοδομούνται από την εντερική χλωρίδα (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007). Στις φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες των β-γλυκανών έχουν αποδοθεί η μεγάλη εμπορική και θρεπτική αξία προϊόντων βρώμης, μετά τον χαρακτηρισμό τους ως βιοενεργά και λειτουργικά συστατικά (Lazaridou et al., 2007).

Συγκεκριμένα, οι β-γλυκάνες πέρα από το ότι αποτελούν πλούσια πηγή διαιτητικών ινών, φαίνεται ότι συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερόλης και στην καλύτερη ρύθμιση των μεταγευματικών επίπεδων της γλυκόζης του αίματος (Tosh, 2007).

#### 1.2.3. <u>Πρωτεΐνες</u>

Η ποιότητα των πρωτεϊνών της βρώμης σαφώς και δεν μπορεί συγκριθεί με τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης, ωστόσο, μεταξύ των δημητριακών, η βρώμη προέχει ως προς την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Παρέχει μια υπέρτατη ισορροπία σε αμινοξέα σε σχέση με άλλα δημητριακά όπως το σιτάρι, το κριθάρι, τη σίκαλη και το καλαμπόκι (Burrows, 1986). Υπερισχύει το πιο ισορροπημένο κλάσμα αποθηκευτικής πρωτεΐνης, η γλοβουλίνη, σε ποσοστό 70-80% ως προς το σύνολο των πρωτεϊνών. Έπονται οι προλαμίνες (5-10%), οι γλουτελίνες (5-10%) και οι αλβουμίνες (15-20%) (Webster, 2002). Περιορισμένης θρεπτικής αξίας αμινοξέα είναι η λυσίνη, η θρεονίνη και η μεθειονίνη (Peterson & Brinegar, 1986). Στο σπόρο της βρώμης οι πρωτεΐνες δεν είναι ισοκατανεμημένες· το εξωτερικό πίτυρο περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό, 49% και το αμυλούχο ενδοσπέρμιο έρχεται δεύτερο, με 45% σε σχέση με το συνολικό ποσοστό πρωτεϊνών της βρώμης (Peterson & Brinegar, 1986). Χαρακτηριστικά, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των σπόρων της βρώμης επηρεάζεται σημαντικά από τα διαθέσιμα επίπεδα αζώτου στο έδαφος, καθώς και από τα επίπεδα υγρασίας που επικρατούν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Burrows, 1986). Κυρίως τρεις παράγοντες καθιστούν το δημητριακό της βρώμης ως βασική πηγή πρωτεϊνών: η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες, η βιοδιαθεσιμότητά τους, και η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε βασικά αμινοξέα (Webster, 2002). Ως προς τη θρεπτική τους αξία, οι πρωτεΐνες, χάριν του αμινοξέος της γλουταμίνης έχει παρατηρηθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη του βλεννογόνου του γαστρεντερικού σωλήνα, βοηθούν στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, και μετριάζουν τα επίπεδα χοληστερόλης (Webster, 2002).

#### 1.2.4. <u>Λίπη</u>

Όμοια με τις πρωτεΐνες, η βρώμη περιέχει και το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δημητριακά. Χαρακτηριστικά, τα ποσοστά ελεύθερων λιπαρών τόσο για τη βρώμη όσο και για κάποια άλλα δημητριακά, παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.6. Στα περισσότερα δημητριακά το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους βρίσκεται στο φύτρο, αλλά στη βρώμη είναι κατανεμημένο σε όλο το σπόρο (Webster, 2002), με ποσοστό πάνω από 50% στο ενδοσπέρμιο (Youngs, 1986). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι το ενδοσπέρμιο της βρώμης περιέχει 6-8% λίπος, ενώ για το σιτάρι, το αντίστοιχο ποσοστό είναι μόλις 0,8-1,0 % (Webster, 2002). Η

περιεκτικότητα σε λίπος ποικίλλει ανάλογα με τις καλλιέργειες και το εύρος θερμοκρασιών κατά την ανάπτυξη του σπόρου της βρώμης, επηρεάζοντας τα ποσοστά των ελεύθερων και δεσμευμένων λιπών (Youngs, 1986).



Σχήμα 1.6. Ποσοστά ελεύθερων λιπαρών (%) σε διάφορα δημητριακά (Youngs, 1986).

Τα τριγλυκερίδια είναι η κύρια μορφή λίπους στη βρώμη, σε ποσοστό 32-56% στο σύνολο του λίπους, αλλά περιέχει και άλλες ομάδες, όπως τα φωσφολιπίδια (5-26%), τα γλυκολιπίδια (7-12%), τις στερόλες (0,1-9,3%) και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (2-11%). Τα βασικότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στη βρώμη είναι το παλμιτικό (15,4-25,8%), το ολεϊκό (18,8-41,3%) και το λινολεϊκό οξύ (31,3-53,0%) (Webster, 2002). Το παλμιτικό οξύ είναι το κυριότερο κορεσμένο λιπαρό οξύ, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα -ολεϊκό και λινολεϊκό οξύ- υπερισχύουν (Youngs, 1986). Η υπεροχή του ολεϊκού και λινολεϊκού οξέος, καθώς και η εξαιρετική αναλογία μονοακόρεστων και πολυακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα, η οποία είναι ίση με ~2,2 (ενώ η προτεινόμενη τιμή ισούται με 1 τουλάχιστον), καθιστούν τη βρώμη επιθυμητό συστατικό σε δίαιτες που αποσκοπούν σε ελάττωση των επιπέδων της χοληστερόλης (Webster, 2002). Η λιπάση, το κυριότερο ένζυμο στη βρώμη, προκαλεί γρήγορη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στην αλεσμένη βρώμη ή στη βρώμη που έχει υποστεί κάποια ζημιά. Πρόκειται για ένα υδρολυτικό ένζυμο το οποίο παράγει ελεύθερα λιπαρά οξέα από τα τριγλυκερίδια, και μερικές φορές από τα γλυκερίδια. Στη βιομηχανία, η δράση αυτού του ενζύμου απενεργοποιείται στη βρώμη επιτυχώς, μέσω της διεργασίας της θέρμανσης με ατμό (Youngs, 1986). Η βρώμη παρουσιάζει ξεχωριστή αντιοξειδωτική ικανότητα, και κάποια από τα συστατικά που συντελούν σε αυτή τη λειτουργία είναι δεσμευμένα στα λίπη. Πρόκειται για τους γλυκερικούς εστέρες του υδροξυκινναμικού, του φερουλικού και του καφεϊκού οξέος. Οι τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε) είναι διαλυτά λίπη και έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, η ατοκοφερόλη είναι συστατικό με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, καθώς επίσης και η β- και γτοκοφερόλη (Youngs, 1986).

#### 1.2.5. <u>Φαινολικές ενώσεις</u>

Ο δημητριακός σπόρος της βρώμης περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος φαινολικών ενώσεων, όπως π.χ. παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος, φαινολικούς γλυκοζίτες, φλαβονοειδή, και άλλα φαινολικά παράγωγα (Webster, 2002). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η βρώμη είναι το μόνο δημητριακό που περιέχει αβενανθραμίδες. Απαντούν σε όλο το τμήμα του σπόρου της, αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εξωτερικό πίτυρο και γενικότερα στα εξωτερικά στρώματα που περιβάλλουν τον σπόρο, παρουσιάζοντας σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webster, 2002). Σε ελεύθερη μορφή, οι φαινολικές ενώσεις σπανίως συσσωρεύονται σε υγιείς ιστούς, αλλά αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα σε βιοσυνθετικές οδούς ως προς το σχηματισμό γλυκοζιτών, εστέρων, αμίδιων, και ακόμη πιο πολύπλοκων συστατικών των κυττάρων (Collins, 1986). Τα περισσότερα διαλυτά φαινολικά οξέα υπάρχουν υπό δεσμευμένη μορφή στη βρώμη. Πιο συγκεκριμένα, οι δεσμευμένες φαινόλες αντιπροσωπεύουν το 66% των ολικών διαλυτών φαινολικών συστατικών στο άλευρο της βρώμης (Webster, 2002).

Η βρώμη περιέχει μία μεγάλη ποικιλία φαινολών χαμηλού μοριακού βάρους. Ακόμη και σε χαμηλές περιεκτικότητες σε συστατικά όπως λίπη, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, η παρουσία των φαινολικών ενώσεων μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυμερών. Ποιοτικές παράμετροι όπως το χρώμα, η οσμή, η γεύση, η σταθερότητα και η θρεπτικότητα, επηρεάζονται τόσο από τον τύπο όσο και από την περιεκτικότητα σε συστατικά φαινολών που συναντώνται στον δημητριακό σπόρο της βρώμης, καθώς επίσης και από τα παράγωγα προϊόντα αυτών (Collins, 1986). Μερικές φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, άλλες λειτουργούν ως μέσα άμυνας για το φυτό κατά των ασθενειών, και κάποιες άλλες καθιστούν τη βρώμη ως μία πολύ σημαντική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοενεργών σκευασμάτων. Συγκεκριμένα, τα παράγωγα του φερουλικού και καφεϊκού οξέος παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, και κυρίως τα παράγωγα του υδοξυκινναμικού οξέος (Webster, 2002).

#### 1.2.6. <u>Βιταμίνες</u>

Οι σημαντικότερες υδατοδιαλυτές βιταμίνες που εμπεριέχονται στο σπόρο της βρώμης είναι η θειαμίνη (B<sub>1</sub>), η νιασίνη και το φολικό οξύ, και απαντούν σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις συνεισφέροντας σε μεγάλο βαθμό στην ανώτερη θρεπτική αξία της βρώμης. Επίσης, στο σπόρο της βρώμης απαντούν και η ριβοφλαβίνη (B<sub>2</sub>), το παντοθενικό οξύ, η πυριδοξίνη (B<sub>6</sub>) και η βιοτίνη. Οι βιταμίνες B βρίσκονται κυρίως στο εξωτερικό στρώμα του πιτύρου, αλλά η θειαμίνη εκτός από το πίτυρο, απαντά και στους ιστούς του φύτρου. Επιπλέον, η βρώμη αποτελεί σημαντική πηγή βιταμίνης Ε, η οποία συναντάται ως ισομερές της τοκοφερόλης ή της τοκοτριενόλης, συστατικά που συχνά αναφέρονται ως ολικές τοκόλες. Η συνολική περιεκτικότητα σε τοκόλες στη βρώμη κυμαίνεται μεταξύ 1,7 και 3,2 mg/100 g. Όσον αφορά την κατανομή τους στον σπόρο της βρώμης, οι τοκοτριενόλες συναντώνται στο ενδοσπέρμιο, ενώ οι α- και γ-τοκοφερόλες βρίσκονται στο φύτρο (Webster, 2002).

#### 1.2.7. Τέφρα και μεταλλικά στοιχεία

Το ποσοστό τέφρας που περιέχει ο δημητριακός σπόρος της βρώμης ισούται περίπου με 1,9%. Όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε μεταλλικά στοιχεία, η βρώμη αποτελεί μία σημαντική πηγή μαγγανίου, μαγνησίου και σιδήρου, καθώς επίσης ασβεστίου, ψευδαργύρου και χαλκού (Lockhart & Hurt, 1986, Webster, 2002). Επίσης, περιλαμβάνει ένα σημαντικό ποσοστό φωσφόρου, όπου το μεγαλύτερο κλάσμα του στη βρώμη, όπως και σε άλλα δημητριακά, βρίσκεται υπό μορφή φυτικού οξέος. Τα μεταλλικά στοιχεία επίσης δεν είναι ισοκατανεμημένα στον σπόρο της βρώμης αλλά συναντώνται κυρίως στο εξωτερικό πίτυρο. Από θρεπτικής άποψης, η βρώμη και τα προϊόντα της (ολικής άλεσης) συνεισφέρουν ικανοποιητικά στις ανάγκες των καταναλωτών για μεταλλικά στοιχεία (Webster, 2002).
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΜΥΛΟΥ

# 2.1. Εισαγωγικά

Το άμυλο μπορεί να τροποποιηθεί χημικά, ενζυμικά ή φυσικά (π.χ. άλεση) με σκοπό να αποκτήσει νέες ιδιότητες (Tester et al., 2004a), καθότι μπορεί να θεωρηθεί "χρήσιμο" μόνο όταν η δομή του έχει διασπαστεί (Oates, 1997, BeMiller, 1997). Η ενζυμική υδρόλυση του αμύλου είναι μία από τις επικρατέστερες ενζυμικές διεργασίες υψηλής εμπορικής αξίας. Γενικά, τα γαμηλού-μοριακού βάρους προϊόντα που προκύπτουν γαρακτηρίζονται από το ισοδύναμο δεξτρόζης (DE), το οποίο σχετίζεται άμεσα με το αριθμητικό-μέσο μοριακό βάρος τους (Marchal et al., 1999). Η ενζυμική υδρόλυση παρουσιάζει κάποια ουσιώδη πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με τη χημική υδρόλυση (με οξέα), διότι δεν απαιτούνται υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες όπως και χαμηλό pH (Yankov et al., 1986). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον των βιομηχανιών για την εφαρμογή της ενζυμικής κατάλυσης έχει ωθήσει στην ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών μεθόδων με νέες και εξελιγμένες ιδιότητες των ενζύμων, αποφέροντας υψηλά κέρδη στη βιομηχανία (Eijsink et al., 2005). Αξίζει να αναφερθεί ότι η ενζυμική υδρόλυση του αμύλου προσφέρει τόσο στη βιομηχανία τροφίμων (γλυκαντικές ύλες, σιρόπια) όσο και στην παρασκευή χημικών (αιθανόλη, ακετόνη, λακτικό οξύ), αλλά επιπρόσθετα αποτελεί μέσο για τη μελέτη της πολύπλοκης δομής του μορίου του αμύλου (Li et al., 2004). Ποικίλα οφέλη μπορούν να αποτυπωθούν σε διάφορα επίπεδα, όσον αφορά στη μηχανική τροφίμων, εμπεριέχοντας βελτιώσεις στις βιομηχανίες μεταποίησης αμύλου και στην αποτελεσματικότερη υδρόλυση, με σκοπό να αποφευχθούν μετασυλλεκτικές απώλειες αλλά και να παρέχονται θρεπτικά οφέλη σε καινοτόμα προϊόντα (Oates, 1997).

Με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας ένα υποσύνολο βιολογικών καταλυτών, τα βιομηχανικά ένζυμα, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία διότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά και επιλεκτικά ως προς τις χημικές δομές που καταλύουν. Λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία και pH) με χρήση μη-τοξικών αντιδραστηρίων, καταλύοντας την παραγωγή σχετικά "καθαρών" προϊόντων, ελαττώνοντας τον όγκο του αποβλήτου (Marrs et al., 1999). Είναι αρκετά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες, διότι προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές, είναι βιοαποδομήσιμα και επιλεκτικά όπως

προαναφέρθηκε, τόσο ως προς το υπόστρωμα που καταλύουν όσο και ως προς τα παραγόμενα προϊόντα. Συγκεκριμένα, οι αμυλάσες βρίσκουν πολλαπλές εφαρμογές σε βιομηχανικές διεργασίες, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό παρέχεται στη βιομηχανία αμύλου για την παραγωγή σιροπιών υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη και για την παραγωγή αιθανόλης (Cherry & Fidantsef, 2003).

# 2.2. Αμυλολυτικά ένζυμα

Τα ένζυμα που καταλύουν το άμυλο αναφέρονται ως αμυλολυτικά ένζυμα, και ταξινομούνται ως υδρολάσες, καταλύοντας τους α-(1→4) και α-(1→6)-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Duedahl-Olesen et al., 2000). Ανάλογα με τη δράση τους χωρίζονται σε 4 υποκατηγορίες: α) ενδοαμυλάσες, β) εξω-αμυλάσες, γ) ένζυμα που καταλύουν τις πλευρικές αλυσίδες (debranching enzymes), και δ) τρανσφεράσες (Van der Maarel et al., 2002). Σε αυτή την παράγραφο θα ασχοληθούμε σε βάθος με τις δύο πρώτες κατηγορίες ενζύμων και πιο συγκεκριμένα με τις πιο αντιπροσωπευτικές αμυλάσες, την α-αμυλάση και τη β-αμυλάση. Η τρίτη κατηγορία, αφορά τα ένζυμα που καταλύουν αποκλειστικά α-(1→6) δεσμούς, με αντιπροσωπευτικά ένζυμα την ισοαμυλάση, την γλυκοαμυλάση και την πουλουλανάση, ενώ στην τέταρτη κατηγορία μπορεί να αναφερθεί χαρακτηριστικά το ένζυμο της αμυλομαλτάσης (Van der Maarel et al., 2002).

Οι αμυλάσες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες ενζύμων που αποικοδομούν τα μόρια του αμύλου προς μεγάλη ποικιλία προϊόντων όπως δεξτρίνες, και σταδιακά προς μικρότερα πολυμερή, δομημένα από μονάδες γλυκόζης (Gupta et al., 2003, Asgher et al., 2007). Εκτός από τη χρήση των αμυλασών στη βιομηχανία τροφίμων, ευρεία είναι και η εφαρμογή τους στις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας, καθώς επίσης και στις φαρμακευτικές εταιρείες (Sarikaya et al., 2000). Η κατηγορία αυτή των ενζύμων είναι ευρέως κατανεμημένη στα μικρόβια, στα φυτά και στα ζώα, και πιο συγκεκριμένα στα πεπτικά υγρά των ζώων (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

*α-Αμυλάση*. Η α-αμυλάση (Ε.С.3.2.1.1.), γνωστή ως ένζυμο "διαλυτοποίησης", είναι ένα ενδοένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση των εσωτερικών α- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμών των μορίων του αμύλου με έναν τυχαίο τρόπο (Nigam & Singh, 1995, Konsula et al., 2004). Ο χαρακτηρισμός του ενζύμου ως ένζυμο "διαλυτοποίησης" έγινε σκόπιμα, διότι θεωρείται ότι είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την υδρολυτική διαλυτοποίηση (αποικοδόμηση) του αμύλου (Nielsen & Borchert, 2000). Ανήκει στην οικογένεια 13 των υδρολασών γλυκοζιτικών δεσμών η οποία περιλαμβάνει ποικίλα ένζυμα (Henrissat, 1991, Nielsen & Borchert, 2000). Απαντά σε αφθονία στη φύση, στο φυτικό και ζωικό βασίλειο, καθώς και σε ποικιλία μικροοργανισμών. Σε πολλά ζώα, αλλά και στον άνθρωπο, η α-αμυλάση εκκρίνεται στο σάλιο όπως υπάρχει και στο πάγκρεας (Tester et al., 2004b, Tester et al., 2006). Συγκεκριμένα, οι α-αμυλάσες βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικίλες εφαρμογές στη βιομηγανία (Pandey et al., 2000) (ειδικά από το είδος Bacillus), κυρίως προς παραγωγή αιθανόλης και σιροπιών γλυκόζης από το άμυλο (Van der Maarel et al., 2002), εξαιτίας της υψηλής θερμοανθεκτικότητας που παρουσιάζουν (Nielsen & Borchert, 2000). Με κάθε δράση της στο αμυλούχο υπόστρωμα η ααμυλάση σχηματίζει ταυτόχρονα ένα νέο αναγωγικό και ένα νέο μη-αναγωγικό άκρο (Jiahua, 1999). Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο της α-αμυλάσης είναι γνωστό ως προς την τυχαία δράση του, με αποτέλεσμα να μειώνει απότομα το ιξώδες ενός διαλύματος αμύλου, παράγοντας ολιγοσακχαρίτες ποικίλου μοριακού βάρους όπως γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη, καθώς και κάποιες δεξτρίνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Colonna et al., 1992, Park & Rollings, 1994). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις η α-αμυλάση παρουσιάζει μη-τυχαία δράση, η οποία οφείλεται στην ύπαρξη πλευρικών αλυσίδων γλυκόζης (διακλαδώσεων) στο υπόστρωμα (π.χ., αμυλοπηκτίνη) (Park & Rollings, 1994). Η δράση της, σε αντίθεση με τη βαμυλάση, δύσκολα θα μπορούσε να "μπλοκαριστεί" από τους α- $(1 \rightarrow 6)$  δεσμούς (Williamson et al., 1992), αλλά είναι ικανή να τους προσπεράσει (χωρίς να τους υδρολύσει) και να συνεχίσει τη δράση της σε γειτονικά γραμμικά τμήματα των μορίων του αμύλου (Banks & Greenwood, 1975, Teauge & Brumm, 1992). Αυτή η πληροφορία ενισχύεται σημαντικά από το γεγονός ότι η ααμυλάση μπορεί να δράσει τόσο στο άμορφο όσο και στο κρυσταλλικό τμήμα των μορίων του αμύλου (Zhou et al., 2004).

Η υδρόλυση του αμύλου από την α-αμυλάση μπορεί να παρασταθεί ως εξής: επιφανειακά, όπου το ένζυμο δημιουργεί κανάλια και εισχωρεί στους αμυλοκόκκους αλλά και εσωτερικά, δρώντας στο εσωτερικό του πυρήνα των διασπασμένων μορίων (Helbert et al, 1996, Tester et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο της α-αμυλάσης πρώτα προχωρά από την επιφάνεια προς το κέντρο του αμυλοκόκκου και στη συνέχεια, ο πυρήνας διαβρώνεται πλήρως και το ένζυμο εξακολουθεί να δρα από το εσωτερικό τμήμα προς την περιφέρεια (Helbert et al., 1996, Sarikaya et al., 2000). Μία παρόμοια εκδοχή είναι ότι η α-αμυλάση αρχικά καταλύει τα άμορφα τμήματα των μορίων του αμύλου (Franco et al., 1988, Hoover & Senanayake, 1996) και στη συνέχεια διεισδύει μέσω των εσωτερικών "καναλιών" στο εσωτερικό των μορίων και το διασπά από μέσα προς τα έξω (Li et al., 2004).

Η ενεργότητα της α-αμυλάσης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διατριβής, εκφράστηκε πρακτικά σε μονάδες (FAU) και ο ορισμός της έχει ως εξής: μία μονάδα της ααμυλάσης (1 FAU) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που αποδομεί 5260 mg αμύλου (επί ξηρού) ανά ώρα, υπό συγκεκριμένες συνθήκες (37 °C, pH 5.6).

β-Αμυλάση. Η β-αμυλάση (E.C.3.2.1.2.), γνωστή ως ένζυμο "σακχαροποίησης" (Muralikrishna & Nirmala, 2005), είναι ένα εξω-ένζυμο που "κόβει" τους α- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμούς στο άμυλο (Muralikrishna & Nirmala, 2005, Oliveira do Nascimento et al., 2006) απελευθερώνοντας επιτυχώς μονάδες β-μαλτόζης από τα μη-αναγωγικά άκρα των αλυσίδων του αμύλου (Oliveira do Nascimento et al., 2006). Απαντάται ευρέως σε πολλά φυτά και σε κάποια βακτήρια (Ziegler, 1999, Yamasaki, 2003), αλλά παράγεται και από μικροοργανισμούς (Saha et al., 1987). Επίσης βρίσκεται στους σπόρους των δημητριακών όπου υφίσταται τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή (Ziegler, 1999, Yamasaki, 2003). Παρουσιάζει τεράστια εμπορική αξία στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών (Saha et al., 1987). Η β-αμυλάση ανήκει στην οικογένεια 14 των υδρολασών γλυκοζιτικών δεσμών (Henrissat, 1991, Oliveira do Nascimento et al., 2006). Η δράση της θα μπορούσε εύκολα να "μπλοκαριστεί" από τις διακλαδώσεις  $[\alpha-(1\rightarrow 6)$  δεσμούς], σε αντίθεση με την α-αμυλάση (Williamson et al., 1992), διότι η β-αμυλάση δεν είναι ικανή να τις προσπεράσει και να συνεχίσει τη δράση της (Marchal et al., 2001). Η γραμμική αμυλόζη θα μπορούσε να οριστεί ως το πολυμερές, το οποίο μπορεί να υδρολυθεί πλήρως μόνο με τη δράση του ενζύμου της β-αμυλάσης (Banks & Greenwood, 1975). Σε αντίθεση με τη δράση των ενδοενζύμων, η δράση αυτής της κατηγορίας των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα μια αργή ελάττωση του ιξώδους ενός διαλύματος αμύλου (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

Όσον αφορά την ενεργότητα της β-αμυλάσης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διατριβής, εκφράστηκε πρακτικά σε μονάδες (°Lintner), και ο ορισμός έχει ως εξής: η βύνη έχει ενζυμική ισχύ ίση με 100 °L όταν 0,1 mL καθαρού διαλύματος βύνης ενεργώντας σε 100 mL ενός διαλύματος αμύλου [2% (w/v), 20 °C] για μία ώρα, θα παράγει αρκετά αναγωγικά σάκχαρα ώστε να ελαττώσει εξ ολοκλήρου 5 mL διαλύματος του αντιδραστηρίου Fehling (100,0 βαθμοί °Lintner ισοδυναμούν με 3,014 × 10<sup>-7</sup> μονάδες katal ή με 18,08 ενζυμικές μονάδες).

# 2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης

Η ενζυμική υδρόλυση του αμύλου επηρεάζεται από τα ένζυμα που ενεργούν σε αυτό με έναν εξαιρετικά πολύπλοκο τρόπο, ο οποίος αποτελεί συνάρτηση πολλών παραγόντων, όπως: παράγοντες που σχετίζονται (α) με τη χημική φύση και φυσική κατάσταση του αμύλου προέλευση, μέγεθος μορίων, κρυσταλλικότητα (βοτανική του αμύλου, αναλογία αμυλόζης/αμυλοπηκτίνης), (β) με τα εναιωρήματα του αμύλου [ιξώδες, αντίσταση στο βαθμό επαναφοράς (retrogradation) ή ζελατινοποίησης], καθώς επίσης και παράγοντες που σχετίζονται (γ) με την καταλυτική διαδικασία (pH, θερμοκρασία, διάρκεια αντίδρασης, προέλευση ενζύμου, αναλογία ενζύμου/υποστρώματος ή απενεργοποίηση ενζύμου και φαινόμενα παρεμπόδισης) (Oates, 1997, Kandra, 2003, Konsula et al., 2004, López et al., 2006). Σύμφωνα με τους Zhang et al. (1999), ο πιο σημαντικός παράγοντας από όλους θεωρείται η δομή του μορίων του αμύλου και η οργάνωσή τους στον αμυλόκοκκο (δομική συγκρότηση των πολυμερικών σωματιδίων).

Τα φαινόμενα παρεμπόδισης κατά την καταλυτική διαδικασία σχετίζονται με την παρουσία διαιτητικών ινών λόγω αύξησης του ιξώδους (Slaughter, et al., 2001, Svihus et al., 2005), καθώς και με την εμφάνιση προϊόντων της υδρόλυσης, τα οποία δρουν ανασταλτικά, μειώνοντας βαθμιαία την ταχύτητα της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή μαλτόζης, αλλά και μαλτοτριόζης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης μειώνουν την ταχύτητα της αντίδρασης. Σε γενικές γραμμές, οι ολιγοσακχαρίτες παρεμποδίζουν ανταγωνιστικά τη δράση των ενζύμων (Colonna et al., 1992, Sanroman et al., 1996). Ωστόσο, η μαλτοτριόζη μπορεί να αποτελέσει νέο υπόστρωμα για το ένζυμο προς παραγωγή μαλτόζης και γλυκόζης (Koyama et al., 2000).

Σημαντική θεωρείται και η συμβολή του παράγοντα της θερμοκρασίας στη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης. Σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται μικρότερη ανομοιογένεια ως προς τα τελικά προϊόντα, τουλάχιστον στην πρώτη φάση της αντίδρασης (Marchal et al., 1999), αλλά και απενεργοποίηση της δράσης των ενζύμων σε κάποιες περιπτώσεις (Apar & Özbek, 2004). Η θερμοανθεκτικότητα των αμυλασών (α-αμυλάση) επηρεάζεται και από την περιεχόμενη υγρασία του συστήματος στο οποίο ενεργεί, καθώς αυξάνεται σε συστήματα με χαμηλά ποσοστά υγρασίας (Samborska et al., 2005). Ωστόσο, επιβράδυνση της διαδικασίας της ενζυμικής υδρόλυσης μπορεί να προκληθεί από την παρουσία σύμπλοκων ενώσεων αμυλόζης-λιπαρών ενώσεων, οι οποίες εμποδίζουν κατά κάποιο τρόπο το ένζυμο στην καταλυτική του δράση στις αλυσίδες της αμυλόζης (Cui & Oates, 1999, Tester et al., 2004b, Tester et al., 2006).

# 2.4. Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των ενζόμων

Έχει αναφερθεί ότι το άμυλο κάθε προέλευσης επιδεικνύει ένα συγκεκριμένο πρότυπο υδρόλυσης δύο φάσεων: σε πρώτη φάση παρατηρείται σχετικά γρήγορη ταχύτητα υδρόλυσης (αρχικά υδρολύονται τα άμορφα τμήματα του μορίου), η οποία ακολουθείται από έναν σταδιακά επιβραδυνόμενο (υδρόλυση του κρυσταλλικού τμήματος του μορίου), αλλά και πιο σταθερό ρυθμό (Bertoft & Manelius, 1992, Oates, 1997, Zhou et al., 2004). Με άλλα λόγια, το ένζυμο αρχικά διαχέεται στην επιφάνεια του υποστρώματος, στη συνέχεια προσροφάται από αυτό και ακολουθεί η καταλυτική αντίδραση (Leloup et al., 1991, Colonna et al., 1992, Oates, 1997). Συγκεκριμένα, για την περίπτωση της α-αμυλάσης, η δράση του ενζύμου έχει περιγραφεί σε τέσσερα στάδια: (α) προσρόφηση του ενζύμου με τυχαίο τρόπο στην επιφάνεια του μορίου του αμύλου, (β) η ενζυμική αντίδραση ξεκινά σε αυτό το σημείο, (γ) η αντίδραση προχωρά ακτινωτά με αποτέλεσμα το σχηματισμό πόρων (και στη συνέχεια καναλιών που θα οδηγήσουν το ένζυμο στο εσωτερικό του μορίου), και τέλος, (δ) το ένζυμο εγκλωβίζεται στο εσωτερικό του μορίου), και τέλος.

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να εξηγήσουν τους πιθανούς μηγανισμούς δράσης της ααμυλάσης και της β-αμυλάσης λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιότητες κάθε ενζύμου ξεχωριστά, καθώς επίσης και τους περιορισμούς στους οποίους υπόκεινται. Ωστόσο, μια επιπρόσθετη ιδιότητα των αμυλασών θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, η "επιλεκτική" δράση, η οποία αποτελεί άμεση συνάρτηση των δομικών χαρακτηριστικών του υποστρώματος (του βαθμού διακλάδωσης). Είναι γνωστό ότι οι α- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμοί που βρίσκονται πλησίον μίας διακλάδωσης  $[\alpha-(1\rightarrow 6) \delta \epsilon \sigma \mu \delta c]$ ,  $\delta \epsilon \nu \mu \pi o \rho o \delta \nu \nu a \nu \delta \rho o \delta \nu \theta o \delta \nu$ . Γενικά, για κάθε ένα  $\alpha-(1\rightarrow 6) \delta \epsilon \sigma \mu \delta$ , τρεις γειτονικοί  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) δεσμοί δεν μπορούν να υδρολυθούν (Park & Rollings, 1994). Βασισμένοι σε αυτή την πληροφορία μπορούμε να ισχυριστούμε ότι όσο αυξάνει η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος ενός διακλαδισμένου πολυσακγαρίτη τόσο μειώνεται ο αργικός ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης. Μια εξήγηση θα μπορούσε να δοθεί αν λάβουμε ως παράδειγμα την περίπτωση της αμυλοπηκτίνης, όπου τα σημεία διακλάδωσης εμφανίζονται ως "συμπλέγματα" στο εσωτερικό του μακρομορίου. Οι α- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμοί που περιέχονται στο μόριό της εντάσσονται σε δύο τύπους: στους δεσμούς που βρίσκονται εξωτερικά του "συμπλέγματος" των διακλαδώσεων, και συνεπώς η δράση της α-αμυλάσης δεν παρεμποδίζεται, και στους δεσμούς που βρίσκονται στο εσωτερικό του "συμπλέγματος", όπου η δράση της α-αμυλάσης παρεμποδίζεται (Park & Rollings, 1994). Αυτό συμβαίνει διότι κάποια τμήματα των μορίων του

αμύλου (άμορφες περιοχές) είναι περισσότερο διαθέσιμα προς κατάλυση σε σχέση με κάποια άλλα (κρυσταλλική περιοχή) (Oates, 1997).

Όπως προαναφέρθηκε, οι α- $(1 \rightarrow 4)$  δεσμοί του υποστρώματος μπορούν να υδρολυθούν από το ένζυμο της α-αμυλάσης, αλλά υπόκεινται σε κάποιους περιορισμούς ως προς τη θέση τους στην αλυσίδα, οι οποίοι είναι οι εξής:

- το ελάχιστο μήκος (γραμμικό) του υποστρώματος να είναι ίσο με 5 μονάδες γλυκόζης,
- η ελάχιστη απόσταση από το αναγωγικό άκρο να ισούται με δύο μονάδες γλυκόζης,
- η ελάχιστη απόσταση από το μη-αναγωγικό άκρο να ισούται με τρεις μονάδες γλυκόζης,
- η ελάχιστη απόσταση από ένα σημείο διακλάδωσης να ισούται με τρεις μονάδες γλυκόζης στην κύρια αλυσίδα προς το αναγωγικό άκρο, δύο μονάδες γλυκόζης προς το μη-αναγωγικό άκρο, και τρεις μονάδες γλυκόζης στη δευτερεύουσα αλυσίδα προς το μηαναγωγικό άκρο,

ενώ, όσον αφορά τη δράση της β-αμυλάσης, οι περιορισμοί έχουν ως εξής:

- το ελάχιστο μήκος του υποστρώματος να είναι ίσο με 4 μονάδες γλυκόζης,
- η ελάχιστη απόσταση της διακλάδωσης από το μη-αναγωγικό άκρο να ισούται με δύο μονάδες γλυκόζης,
- η υδρόλυση σταματά στη γειτνίαση με τα σημεία διακλάδωσης· η ελάχιστη απόσταση από το αναγωγικό άκρο, αλλά και από το σημείο διακλάδωσης ισούται με δύο μονάδες γλυκόζης (Hiromi et al., 1983, Ajandouz et al., 1992, MacGregor et al., 1994, Wojciechowski et al., 2001).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η "μη-τυχαία" δράση των δύο αμυλασών (α-αμυλάση και βαμυλάση) οδήγησε αρκετούς ερευνητές να αναπτύξουν κάποια μοντέλα περιγράφοντας τη δράση τους. Χαρακτηριστικά, στην περίπτωση των υποστρωμάτων των πολυμερών, οι Robyt και French (1976) ήταν οι πρώτοι που πρότειναν τρεις μηχανισμούς δράσης ή προσβολής για το ένζυμο της α-αμυλάσης: (α) την απλή δράση του ενζύμου προς ένα μόνο υπόστρωμα τη φορά (προσβολή μιας μόνον αλυσίδας), όπου το ένζυμο καταλύει πλήρως το υπόστρωμα και έπειτα επιτίθεται σε νέο υπόστρωμα, (β) την προσβολή πολλών αλυσίδων, όπου το ένζυμο με τυχαίο τρόπο καταλύει ένα δεσμό σε κάθε υπόστρωμα και αμέσως μετά επιτίθεται σε νέο υπόστρωμα με την ίδια τακτική, και (γ) την πολλαπλή προσβολή, η οποία αποτελεί ενδιάμεση περίπτωση μεταξύ των (α) και (β), όπου σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (Robyt & French, 1967, Rollings, 1985). Η πολλαπλή προσβολή οδηγεί στην παραγωγή ολιγοσακχαριτών μικρού μοριακού βάρους, ήδη από τα αρχικά στάδια της υδρόλυσης της αμυλόζης, ενώ η προσβολή πολλών αλυσίδων όχι (Thoma, 1976, Banks & Greenwood, 1977). Κάποιοι άλλοι διαφοροποίησαν ελαφρώς τις τρεις παραπάνω περιπτώσεις, προτείνοντας δύο περιπτώσεις εναλλακτικά, όσον αφορά την α-αμυλόλυση της αμυλόζης (σε διάλυμα): την πολλαπλή προσβολή και την επιλεκτική δράση. Στην πρώτη περίπτωση, όλοι οι γλυκοζιτικοί δεσμοί έχουν την ίδια πιθανότητα να υδρολυθούν, ενώ στην επιλεκτική δράση το ένζυμο καταλύει τους δεσμούς με βάση τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν πιο πάνω, μέχρι πλήρους υδρόλυσης του υποστρώματος (Colonna et al., 1992).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΒΡΩΜΗ – ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Ως "λειτουργικά τρόφιμα" δημητριακών μπορούν να οριστούν τα προϊόντα εκείνα τα οποία πωλούνται στην αγορά, μοιάζουν στην εμφάνιση με τα συμβατικά προϊόντα τροφίμων και μπορούν να αποτελούν τμήμα της καθημερινής διατροφής παρέχοντας όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, οι ιδιαίτερες διαδικασίες που ακολουθούνται κατά την παραγωγή τους στη βιομηχανία τους προσδίδουν ποικίλα λειτουργικά οφέλη, όπως για παράδειγμα τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών. Η ευεργετική επίδραση των προϊόντων αυτών είναι εμφανής, έστω και αν υιοθετηθούν για ένα μικρό χρονικό διάστημα στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου (Zawistowski J., 2007, Dean et al., 2007).

Στις μέρες μας, η συνεχής παραγωγή νέων λειτουργικών προϊόντων τροφίμων με χρήση καινοτόμων τεχνολογιών από τις βιομηχανίες αποτελεί απόρροια της αυξημένης ζήτησης, της ενημέρωσης του καταναλωτικού κοινού ως προς τα ποικίλα θρεπτικά οφέλη τους, με αποτέλεσμα το κοινό να προσανατολίζεται σε μία περισσότερο βελτιωμένη και ισορροπημένη διατροφή (Verschuren, 2002). Τα μη-γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν μία σημαντική κατηγορία λειτουργικών τροφίμων που έχουν ως βάση τα δημητριακά κατά κύριο λόγο και καταναλώνονται από ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων με δυσανεξία στη λακτόζη. Επιπλέον, παρατηρείται μια τάση αντικατάστασης των γαλακτοκομικών προϊόντων (dairy products) από τα μη-γαλακτοκομικά (non-dairy products), λόγω της αυξημένης πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος στον οργανισμό. Πολλά από τα προϊόντα που κυκλοφορούν στο εμπόριο έχουν ως βάση τους τη βρώμη, δημητριακό το οποίο περιέχει μεν ένα μεγάλο ποσοστό λιπαρών, αλλά κατά κύριο λόγο ακόρεστων.

Το δημητριακό της βρώμης λόγω της ιδιαίτερης χημικής του σύστασης τείνει να γίνεται ολοένα και περισσότερο δημοφιλές στην ανθρώπινη διατροφή, αποτελώντας τη βάση για έναν μεγάλο αριθμό προϊόντων τροφίμων. Αυτό συμβαίνει διότι παρέχει μία βέλτιστη ισορροπία μεταξύ των θρεπτικών συστατικών του, η οποία είναι ικανοποιητικά προσαρμοσμένη στις ανθρώπινες ανάγκες. Δεδομένου ότι ο δημητριακός σπόρος της βρώμης εμπεριέχεται εξ ολοκλήρου στα

προϊόντα ολικής άλεσης δίχως να αφαιρεθεί το εξωτερικό τμήμα του (πίτυρο), κανένα από τα θρεπτικά συστατικά του δε χάνεται κατά τη διάρκεια των διεργασιών που πραγματοποιούνται στη βιομηχανία (Schrickel, 1986).

# 3.1. Προϊόντα βρώμης

Η βρώμη καταναλώνεται ευρέως στο πρωινό τμήμα της διατροφής του ανθρώπου, αρχικά ως ακατέργαστο δημητριακό (νιφάδες βρώμης-Quaker). Εν συνεχεία, μέσω τεχνολογικών και βιοτεχνολογικών διεργασιών έχει προκύψει μια σειρά προϊόντων στο εμπόριο τροφίμων, για το λόγο ότι ο δημητριακός σπόρος, και κυρίως το πίτυρο της βρώμης, προσφέρουν πολλαπλά λειτουργικά οφέλη (Burrows, 1986). Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει στις β-γλυκάνες της βρώμης, καθότι η αποδοχή τους ως λειτουργικά και βιοενεργά συστατικά τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την ενσωμάτωσή τους σε σύνθετα τρόφιμα. Η προσθήκη αλεύρου, πιτύρων ή άλλων κλασμάτων βρώμης εμπλουτισμένων σε β-γλυκάνες έχει ήδη πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετά προϊόντα, όπως δημητριακά πρωινού, ζυμαρικά και αρτοσκευάσματα, αυξάνοντας την περιεκτικότητα των β-γλυκανών στα τρόφιμα αυτά (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007).

Τα προϊόντα βρώμης, τα οποία προκύπτουν μέσα από μια σειρά ποικίλων διεργασιών, δύνανται να περιέχουν ένα μεγάλος εύρος β-γλυκανών ποικίλου μοριακού βάρους (Salovaara et al., 2007). Ακόμη και σε ρευστή μορφή (χαμηλό ιξώδες) περιέχοντας χαμηλού μοριακού βάρους βγλυκάνες (80 kD), έχει αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης (Salovaara et al., 2007, Zhang et al., 2007). Συγκεκριμένα, η μετατροπή της βρώμης προς ένα τελικό προϊόν σε ρευστή μορφή (ρόφημα), περιλαμβάνει μία σειρά διεργασιών όπως: σχηματισμό νιφάδων, υγρή άλεση, υδρόλυση με αμυλάσες, διαγωρισμό με διαχωριστήρα (decanter), ομογενοποίηση, αποστείρωση σε πολύ υψηλή θερμοκρασία και ασηπτική συσκευασία (Lindahl et al., 1997). Οι παραπάνω μηχανικές και υδροθερμικές διεργασίες είχαν ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν την κατανομή και τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών που εμπεριέχονται στη βρώμη. Οι τρεις πρώτες διεργασίες (σχηματισμός νιφάδων, υγρή άλεση, υδρόλυση) διευκόλυναν την καλύτερη διάλυση των συστατικών, ενώ η διαδικασία του διαχωρισμού με διαχωριστήρα (decanter) διαχώρισε και απομόνωσε τα αδιάλυτα συστατικά από το υγρό κλάσμα. Τα αδιάλυτα συστατικά περιλαμβάνουν κυρίως αδιάλυτες φυτικές ίνες, δεσμευμένες βιταμίνες, μέταλλα και πρωτεΐνες (Zhang et al., 2007). Το τελικό προϊόν της παραπάνω διαδικασίας είναι το γάλα βρώμης (OATLY AB, Landskrona, Sweden), το οποίο απευθύνεται σε άτομα που έχουν δυσανεξία στη λακτόζη, περιέχοντας μαλτόζη αντί λακτόζης. Έχει μεγάλη απήχηση στο καταναλωτικό κοινό, διότι έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου προκαλώντας σημαντική μείωση στα επίπεδα χοληστερόλης.

Σε έρευνα των Önning et al. (1998) μελετήθηκε η επίδραση του γάλακτος βρώμης όσον αφορά τα λιπίδια πλάσματος, τη γλυκόζη, την ινσουλίνη και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, το γάλα βρώμης συμπεριλήφθηκε στη διατροφή ενός συνόλου υγιών ανθρώπων (24 άτομα, άνδρες και γυναίκες για 4 εβδομάδες) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με το γάλα σόγιας και το αγελαδινό γάλα. Η κατανάλωση γάλακτος βρώμης είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα (LDL) χοληστερόλης (κατά 9%), στα ίδια περίπου επίπεδα με το γάλα σόγιας, το οποίο αποδόθηκε στο υψηλό ποσοστό β-γλυκανών (0,4%) και στα χαμηλά επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων. Αντίθετα, η κατανάλωση του αγελαδινού γάλακτος δεν είχε καμία επίδραση ως προς τα επίπεδα LDL χοληστερόλης. Επιπλέον, τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης μειώθηκαν σημαντικά (-0,2 mmol/L) με την κατανάλωση γάλακτος βρώμης, ενώ το γάλα σόγιας προκάλεσε μικρότερη μείωση (-0,1 mmol/L). Σε αντίθεση, το αγελαδινό γάλα δεν είχε καμία επίδραση. Όσον αφορά την HDL χοληστερόλη, το γάλα βρώμης δεν είχε καμία επίδραση, ενώ το αγελαδινό γάλα προκάλεσε αύξηση. Η παραπάνω έρευνα απέδειξε ότι το γάλα βρώμης θα μπορούσε να καταναλωθεί ως υποκατάστατο των άλλων δύο (αγελαδινό και γάλα σόγιας), προσφέροντας λειτουργικά οφέλη, καθώς μείωσε σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης.

Βασισμένοι στην ίδια πατέντα (Lindahl et al., 1997), οι Mårtensson et al. (2002) παρήγαγαν έναν τύπο γιαουρτιού μη-γαλακτοκομικού (non-dairy) με βάση τη βρώμη, προσθέτοντας μία καλλιέργεια (Lb. rhamnosus), ενώ σε μία πιο πρόσφατη έρευνα μελέτησαν την επίδραση ενός προϊόντος ζύμωσης με βάση τη βρώμη, και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι μπορεί να μειώσει τα επίπεδα χοληστερόλης του αίματος και να ενισχύει τη δράση της γαστροεντερικής χλωρίδας (Mårtensson et al., 2005). Οι Blandino et al. (2003) ανέπτυξαν επίσης ένα προϊόν με βάση τη βρώμη, το yosa, το οποίο καταναλώνεται κυρίως στις σκανδιναβικές χώρες (Φιλανδία). Πρόκειται για ένα προϊόν που μοιάζει με το γιαούρτι, δεν περιέχει λακτόζη, είναι χαμηλό σε λιπαρά, αλλά είναι πλούσιο σε διαιτητικές ίνες βρώμης και προβιοτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB). Συνδυάζει αφενός την θετική επίδραση των διαιτητικών ινών για τη μείωση της χοληστερόλης, και αφετέρου τις ευεργετικές δράσεις των βακτηρίων (LAB) ως προς την διατήρηση και βελτίωση της ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας του καταναλωτή (Blandino et al., 2003), Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010). Ομοίως, οι Angelov et al. (2006)

στηριζόμενοι στην ίδια λογική, παρήγαγαν ένα ρόφημα με βάση τη βρώμη, πλούσιο σε βγλυκάνες σε ποσοστό 0,31-0,36%, ποσοστό το οποίο παραμένει αμετάβλητο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά και κατά την αποθήκευση του προϊόντος. Κατόπιν έρευνας συμπέραναν ότι το ρόφημα αυτό μείωσε τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης κατά 20-30% και δύναται να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον, οι β-γλυκάνες έχουν προταθεί για την αντικατάσταση του λίπους στο τυρί (Volikakis et al., 2004), και στο γιαούρτι (Domagala et al., 2006).

# 3.2. Διατροφικοί ισχυρισμοί για τα προϊόντα βρώμης

Σύμφωνα με το FDA (Food and Drug Administration) των ΗΠΑ, τα προϊόντα βρώμης που περιέχουν συγκεκριμένες ποσότητες διαλυτών διατητικών ινών μπορούν να προσφέρουν ποικίλα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζοντας τα στοιχεία συνολικά 37 κλινικών μελετών, το FDA επέτρεψε τον πρώτο διατροφικό ισχυρισμό υγείας για τα προϊόντα με πίτυρο βρώμης, ο οποίος αναφέρει ότι: "Οι διαλυτές διαιτητικές ίνες από προϊόντα όπως τα πίτυρα βρώμης, ως μέρος μιας διατροφής χαμηλής σε κορεσμένα λιπαρά και χοληστερόλη, μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων" (FDA, 1996, Önning, 2007). Επίσης, η ευεργετική δράση των β-γλυκανών βρώμης στη μείωση της χοληστερόλης του αίματος, μέσα από μία ισορροπημένη διατροφή, επιβεβαιώθηκε και από το Σουηδικό Τδρυμα Διατροφολογίας SNF, Swedish Nutrition Foundation, το 2004 (www.snf.ideon.se/snf/en/rh/Generic\_claims.htm, Μπιλιαδέρης, κ. ά., 2007).

#### 3.3. Η ευεργετική δράση των διαιτητικών ινών

Έχουν διεξαχθεί αρκετές έρευνες μελετώντας την ιδιότητα της βρώμης να μειώνει τα επίπεδα ορού χοληστερόλης και γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό (Kahlon et al., 1993, Kalra & Jood, 2000, Saltzman et al., 2001, Virkki et al., 2005), η οποία σχετίζεται κυρίως με τις διαλυτές διαιτητικές ίνες που περιέχει και τις φυσιολογικές δράσεις τους. Πιο συγκεκριμένα, οι διαλυτές διαιτητικές ίνες αυξάνουν τον χρόνο παραμονής της τροφής στο έντερο, επιβραδύνουν την κένωση του περιεχόμενου του στομάχου και την απορρόφηση της γλυκόζης, και δεσμεύουν τοξικές ουσίες. Αυτές και άλλες δράσεις των β-γλυκανών οδηγούν στη μείωση των μεταγευματικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, στη μείωση της χοληστερόλης και οι αδιάλυτες ίνες ευεργετικές βράσεις, ενάντια στον καρκίνο (Slavin et al., 2007). Ωστόσο, και οι αδιάλυτες ίνες ίνες δράσεις, ενάντια στον καρκίνο (Slavin et al., 1999, Virkki et al., 2005) και

συγκεκριμένα, έρευνες σε ζώα έχουν αποδείξει ότι μειώνουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Jones, 2007). Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι με τους οποίους οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες βελτιώνουν τη λειτουργία του παχέος εντέρου και γενικότερα του γαστρεντερικού σωλήνα. Πιο συγκεκριμένα, μειώνουν τον χρόνο μεταφοράς της τροφής στο έντερο, αυξάνουν την ποσότητα των κοπράνων και επιβραδύνουν την απορρόφηση της γλυκόζης και την υδρόλυση (πέψη) του αμύλου (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007). Ωστόσο, ανάλογα με την προέλευση των ινών, η επίδραση στην αναστολή των ασθενειών μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο σημαντική. Για παράδειγμα, οι β-γλυκάνες της βρώμης έχουν ευεργετική επίδραση στη μείωση της χοληστερόλης, ενώ οι ίνες του ρυζιού δεν είναι τόσο αποτελεσματικές (Jones, 2007).

Γενικά, δίαιτες πλούσιες σε διαιτητικές ίνες από σπόρους δημητριακών ολικής άλεσης σχετίζονται με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη τύπου ΙΙ και παχυσαρκίας, καθώς επίσης και με τη μείωση των περιστατικών καρδιαγγειακών νοσημάτων και ισχαιμικών επεισοδίων (κίνδυνος αθηροσκλήρωσης) (Mårtensson et al., 2005) και γενικότερα, της θνησιμότητας προερχόμενης απ' αυτές τις ασθένειες διαμέσου μεταβολικών οδών, όπως είναι η μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος, η μείωση των λιπιδίων και της πίεσης του αίματος, η αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και η βελτίωση του ελέγχου της γλυκόζης στο αίμα

Οι ποικίλες φυσιολογικές δράσεις των διαιτητικών ινών αποδίδονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μη-πεπτών πολυσακχαριτών τους, όπως είναι η ικανότητα συγκράτησης νερού και διόγκωσης, η ιδιότητά τους να μειώνουν τη διάχυση των θρεπτικών συστατικών μέσω της αύξησης του ιξώδους και πιθανώς σχηματισμού πηκτώματος στο γαστρεντερικό σωλήνα, η ικανότητα δέσμευσης τοξικών ουσιών και η ευεργετική για την υγεία συμβολή των προϊόντων βακτηριακής αποικοδόμησής τους (μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα) στο παχύ έντερο. Οπότε, πέραν της συγκέντρωσης των β-γλυκανών σε ένα προϊόν, η διαλυτότητα, το μοριακό βάρος και το ιξώδες έχουν βρεθεί ότι ρυθμίζουν σε σημαντικό βαθμό τη φυσιολογική δράση των μη-πεπτών πολυσακχαριτών (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007).

# 3.4. Οφέλη στην ανθρώπινη υγεία – Μηχανισμοί δράσης

Τα εμφράγματα μυοκαρδίου, τα στηθάγχη, και οι καρδιακές προσβολές είναι μερικές από τις βασικότερες καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD). Καθοριστικής σημασίας παράγοντας που σχετίζεται με την εμφάνιση των παραπάνω ασθενειών είναι η χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low-density lipoprotein, LDL). Η LDL είναι υψηλή σε χοληστερόλη, και η ανύψωση των επιπέδων της επηρεάζει άμεσα την αλληλεπίδραση μεταξύ χοληστερόλης του αίματος και κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα κορεσμένα λίπη ανεβάζουν τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, και LDL χοληστερόλης, και τα μεγάλου μήκους ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνουν τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων (Önning, 2007).

Τα προϊόντα τροφίμων ολικής άλεσης συστήνονται για την προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις διότι περιέχουν πολλά συστατικά που δρουν ανασταλτικά, όπως οι διαιτητικές ίνες, μικροποσότητες ιχνομετάλλων, φυτοοιστρογόνα, και αντιοξειδωτικές ουσίες (Slavin et al., 1999, Katcher et al., 2008). Κάποια άλλα συστατικά που μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων είναι τα φαινολικά οξέα, οι στερόλες, η βιταμίνη Ε, ενώ το νάτριο αυζάνει τον κίνδυνο, ειδικά για καρδιακές προσβολές (Önning, 2007, Andersson et al., 2010). Οι Katcher et al. (2008) απέδειξαν ότι μία δίαιτα με δημητριακά ολικής άλεσης μπορεί να μειώσει σημαντικά το βάρος του ανθρώπου, μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι διαιτητικές ίνες έχουν αναφερθεί επανηλλειμένα στη βιβλιογραφία για τη μείωση των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Önning, 2007).

Στη βρώμη, το συστατικό εκείνο που ελαττώνει σημαντικά τα επίπεδα χοληστερόλης είναι οι διαλυτές φυτικές ίνες, και πιο συγκεκριμένα, οι β-γλυκάνες. Οι β-γλυκάνες παίζουν έναν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του σωματικού βάρους, όχι μόνο μέσω της ρύθμισης της γλυκόζης και της ινσουλίνης και της ευεργετικής της δράσης στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αλλά και μέσω της αίσθησης του κορεσμού, λόγω της αύξησης του ιξώδους στο περιεχόμενο του στομάχου και της μείωσης της απορρόφησης της τροφής από το λεπτό έντερο, δράσεις που φαίνεται ότι οδηγούν στη μείωση της όρεξης (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007, Tosh, 2007). Επίσης,

μέσα από έναν σημαντικό αριθμό μελετών, έχει αποτυπωθεί ο ευεργετικός ρόλος των βγλυκανών των δημητριακών στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης του αίματος και στην καλύτερη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών (Brown et al., 1999, Andersson et al., 2010). Συγκεκριμένα, η κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν δημητριακά (κυρίως προϊόντων ολικών δημητριακών σπόρων) φαίνεται ότι επιφέρει επιλεκτική μείωση της LDL-χοληστερόλης ή της "κακής" χοληστερόλης, ενώ είτε αυξάνει την HDL-χοληστερόλη ή "καλή" χοληστερόλης ή αυξάνει την αναλογία της HDL προς LDL χοληστερόλης (Μπιλιαδέρης κ.ά., 2007). Οι Brown et al. (1999), συνοψίζοντας τα αποτελέσματα 25 διαφορετικών μελετών, βρήκαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης ανά 3,0 g ημερήσιας κατανάλωσης βγλυκανών βρώμης κατά 0,12 mmol/L στην ολική, και 0,11 mmol/L στην LDL χοληστερόλη, ενώ τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά.

Η σχέση μεταξύ χοληστερόλης και κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα σε διαφορετικούς πληθυσμούς και μορφωτικό επίπεδο έχει μελετηθεί εκτενώς. Μάλιστα, η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα θεωρείται ως ένας αρκετά αξιόπιστος δείκτης κινδύνου. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι στατιστικά οι πληθυσμοί με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου. Αντίθετα, μία μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο αίμα φαίνεται να ελαττώνει τον κίνδυνο. Επίσης, μικρές μεταβολές (μείωση) στην ολική- και LDL-χοληστερόλη, σε επίπεδο πληθυσμού, μπορεί να έχουν πολλαπλάσια μεγαλύτερες επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία σε ό, τι αφορά τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης περιστατικών με καρδιαγγειακά νοσήματα (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007).

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των β-γλυκανών βρώμης σε ό, τι αφορά τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης δεν είναι ακριβώς γνωστός. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ποιος είναι ο ρόλος του μοριακού βάρους των β-γλυκανών, και σε ποιο βαθμό άλλα συστατικά της βρώμης συνεισφέρουν στα λειτουργικά οφέλη (Andersson et al., 2010). Οι διαλυτές β-γλυκάνες θεωρούνται ότι αυξάνουν σημαντικά το ιξώδες του εντερικού περιεχομένου και μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών. Παράλληλα, δεσμεύουν τα χολικά άλατα, εμποδίζοντας έτσι την επαναρρόφησή τους στο τελικό τμήμα του εντέρου. Με την αποβολή των χολικών αλάτων στα κόπρανα, η συγκέντρωσή τους σύνθεσής τους στο ήπαρ από τη χοληστερόλη, η οποία χρησιμοποιείται ως πρόδρομος ουσία. Έτσι, η χοληστερόλη

μειώνεται στο αίμα και δεν χρησιμοποιείται στην παραγωγή των λιποπρωτεϊνών. Μια άλλη υπόθεση εστιάζεται στη μικροβιακή αποικοδόμηση των β-γλυκανών στο παχύ έντερο και στην παραγωγή προπιονικού οξέος, το οποίο επηρεάζει το μεταβολισμό της χοληστερόλης στο ήπαρ, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της στο αίμα (Μπιλιαδέρης κ. ά., 2007).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΤΑ ΑΓΡΟ-ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

# 4.1. Διεργασίες μεμβρανών, ιδιότητες και μηχανισμοί

Οι διεργασίες μεμβρανών περιλαμβάνουν διάφορες τεχνολογικές εφαρμογές (π.χ. μικροδιήθηση, υπερδιήθηση, νανοδιήθηση, αντίστροφη ώσμωση), χρησιμοποιώντας ημιπερατές μεμβράνες προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός ή κλασματοποίηση συστατικών σε ένα διάλυμα. Για παράδειγμα, η ημιπερατή μεμβράνη διαπερνάται από ορισμένες ενώσεις με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (π.γ. μέγεθος, ταχύτητα διάχυσης, ηλεκτρικό φορτίο), ενώ κάποιες άλλες συγκρατιούνται (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001, Γαλανάκης, 2010). Η κύρια διαφορά μεταξύ των τεσσάρων αυτών τύπων μεμβρανών, πέραν του διαφορετικού τρόπου κατασκευής τους, είναι η διαφορά του μεγέθους των πόρων, όπου και μας δίνει πολύ μεγάλη ποικιλία διαφορετικών (100-500)διαχωρισμών. Η μικροδιήθηση kDa) εφαρμόζεται για το διαγωρισμό μικροοργανισμών και αιωρούμενων στερεών από το νερό και τα διαλυμένα συστατικά. Η υπερδιήθηση (2-100 kDa) χρησιμοποιείται κυρίως για τη συγκράτηση μακρομορίων (πρωτεΐνες, πηκτίνες) και επιτρέπει τη διέλευση μικρομορίων (νερό, άλατα, σάκχαρα) (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001), ενώ στη νανοδιήθηση (<1 kDa), συγκρατούνται και μικρότερα μόρια, όπως οι φαινόλες και κάποια άλατα. Τέλος, στην αντίστροφη ώσμωση (<0,2 kDa) το μόνο συστατικό που διαπερνά τη μεμβράνη είναι το νερό (Nilsson, 2007).

Οι παραπάνω διεργασίες εξαρτώνται από το είδος της μεμβράνης και την δρώσα δύναμη, η οποία εφαρμόζεται και δίνει την ώθηση για την πραγματοποίηση των διεργασιών. Συνεπώς, χωρίζουμε τις μεμβράνες σύμφωνα με τη δρώσα δύναμη, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι η βαθμίδα της πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001, Mulder, 1996). Η ημιπερατότητα της μεμβράνης σε συνδυασμό με τη δρώσα δύναμη καθορίζουν τον κύριο μηχανισμό του διαχωρισμού, και κατά συνέπεια το είδος της πρακτικής εφαρμογής μιας δεδομένης διεργασίας. Τυπικά, η κρίσιμη ιδιότητα για τον επιτελούμενο διαχωρισμό είναι το μοριακό βάρος (MB) ενός συστατικού. Το ελάχιστο MB του συστατικού που μας ενδιαφέρει να διαχωρίσουμε και που συγκρατείται κατά 90% χαρακτηρίζει τη μεμβράνη, και συνήθως αναφέρεται ως τιμή "μοριακού κατωφλιού" (Molecular Weight Cut Off, MWCO). Η τιμή αυτή κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 500 kDa (Γκέκας κ. ά., 2002, Γαλανάκης, 2010). Ωστόσο, σπάνια η πίεση είναι η μόνη δρώσα δύναμη. Δευτερεύουσες δρώσες δυνάμεις μπορεί να προέρχονται από την πόλωση συγκέντρωσης ή/και τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταφερόμενων μορίων και του υλικού της μεμβράνης. Η μεταφορά του τροφοδοτούμενου διαλύματος διαμέσου της επιφάνειας της μεμβράνης προκαλεί τη συσσώρευση της διαλυμένης ουσίας από την επιφάνεια στα κανάλια της μεμβράνης. "Πόλωση συγκέντρωσης" παρατηρείται όταν τα συσσωρευμένα στερεά βρίσκονται σε εν διαλύσει κατάσταση, αλλά με μεγάλη συγκέντρωση διαλυμένων στερεών. Αυτό σημαίνει ότι θα υπάρχει ένα διαχωριστικό στρώμα εκεί όπου η ανταλλαγή διαλυμάτων θα είναι μικρότερη απ' ότι στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην επιφάνεια θα συνεχιστεί μέχρι ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης, στο οποίο η αντίστροφη διάχυση της διαλυμένης ουσίας θα ισούται με τη διαλυμένη ουσία που μεταφέρεται στη μεμβράνη από τη ροή. Το στρώμα πόλωσης προσφέρει μία πρόσθετη αντίσταση στη ροή διαμέσου της μεμβράνης και αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη διεργασία (Γκέκας & Μπαλτά, 2005). Επίσης, ένα από τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών που αξίζει να αναφερθεί, είναι η τάση που έχει να μειώνει την απόδοσή της κατά τη διάρκεια χρήσης της ("fouling effects"), η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το αν η μεμβράνη είναι υδρόφιλη ή υδρόφοβη, καθώς επίσης και από τις αντίστοιχες ιδιότητες της διαλυμένης ουσίας. Δεδομένου ότι η μεμβράνη συγκρατεί κατά ένα βαθμό τις διαλυμένες ουσίες που την διαπερνούν, είναι αναμενόμενο ότι κάποια στιγμή θα υπάρξει συσσώρευση μορίων κοντά στην επιφάνειά της. Αυτή η συσσώρευση θα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός αρκετά συμπυκνωμένου στρώματος πλησίον της μεμβράνης, το οποίο παρεμποδίζει τα φαινόμενα μεταφοράς (π.χ. αντίσταση στην πόλωση συγκέντρωσης). Τέτοια φαινόμενα παρατηρούνται κυρίως σε διαλύματα που περιέχουν πρωτεΐνες (Mulder, 1996). Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζουν και τα χαρακτηριστικά του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης σε σύγκριση με το μέγεθος της διαλυμένης ουσίας (Γκέκας & Μπαλτά, 2005).

# 4.2. Τύποι μεμβρανών

Έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία μεμβρανών με διαφορές, είτε στη δομή είτε στα υλικά κατασκευής· υπάρχουν κεραμικές μεμβράνες, σωληνοειδής, επίπεδες πολυμερικές κ.ά. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι επίπεδες μεμβράνες όπου κατασκευάζονται από πολυμερή σε ένα πλήθος δομών ανάλογα με το διαχωρισμό και τα χαρακτηριστικά του διηθήματος. Οι επίπεδες μεμβράνες μεμβράνες έχουν κυρίως πειραματική χρήση για το χαρακτηρισμό της διαπερατότητας μιας μεμβράνης. Οι μεμβρανοθήκες είναι εύκολο να κατασκευαστούν και να χρησιμοποιηθούν,

επίσης η επιφάνεια της μεμβράνης είναι καλά ορισμένη. Σε μερικές περιπτώσεις οι μεμβρανοθήκες είναι ενσωματωμένες σαν ένα πολυστρωματικό σάντουιτς ή πεπιεσμένο φίλτρο, διάταξη πλακών και πλαισίων (plate and frame) (Σχήμα 4.1.). Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του τύπου συστήματος είναι η πολύ μικρή ενεργή επιφάνεια μεμβράνης ανά όγκο διαχωριστή (Γκέκας & Μπαλτά, 2005).



Σχήμα 4.1. Σύστημα μεμβρανών πλακών και πλαισίων (plate and frame) (Πηγή: Γκέκας & Μπαλτά, 2005).

Όσον αφορά τα υλικά κατασκευής των μεμβρανών υπερδιήθησης, χαρακτηριστικά αναφέρονται οι μεβράνες αναγγενημένης κυτταρίνης (RC), πολυαμιδίου (PA), πολυσουλφόνης (PS), πολυαιθεροσουλφόνης (PES) και πολυολεφίνης (PO). Κάθε διαφορετικό υλικό παρουσιάζει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή, τις συνθήκες του πειράματος (σύσταση του διαλύματος τροφοδοσίας, τιμές πιέσεων, θερμοκρασία, pH, κ.ά.), αλλά και τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και της μεμβράνης. Για παράδειγμα, ένα μεγάλο μειονέκτημα των PS και PES μεμβρανών σχετίζεται με την υδροφοβικότητά τους, κάτι που δεν παρατηρείται για την RC μεμβράνη. Η RC είναι περισσότερο υδρόφιλη, με αποτέλεσμα να εμφανίζει μικρότερη τάση για υποβάθμιση της απόδοσής της (fouling), σε αντίθεση με τις υδρόφοβες μεμβράνες. Ωστόσο, η PS παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα, με ένα εύρος pH μεταξύ 1-14, και θερμοκρασιακό εύρος ίσο με 0-80 °C, ενώ η μεμβράνη κυτταρινικής σύστασης δεν είναι τόσο σταθερή (εύρος pH ίσο με 1-10, και θερμοκρασίας ίσο με 0-60 °C). Συνεπώς, η επιλογή του βέλτιστου υλικού μεμβράνης αποτελεί της συγκεκριμένης εφαρμογής (Gekas et al., 1993).

# 4.3. Η διεργασία της υπερδιήθησης

Το μέγεθος των σωματιδίων που διαχωρίζονται με τη διεργασία της υπερδιήθησης (UF) είναι της τάξης: 0,002–0,2 μm, σε πίεση λειτουργίας 1–10 bar. Οι μεμβράνες UF ουσιαστικά επιτρέπουν στα άλατα, στα οργανικά οξέα, στη γλυκόζη και σε μικρότερα πεπτίδια να τη διαπερνούν μαζί με το νερό, ενώ μεγάλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες κλπ, απομακρύνονται πλήρως ή μερικώς ανάλογα με το ακριβές μέγεθος των πόρων. Η ωσμωτική πίεση τέτοιων συστατικών υψηλού MB είναι αρκετά χαμηλή και γι' αυτό η διαδικασία εκτελείται σε χαμηλές πιέσεις της τάξης των 1-10 bar (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001). Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της υπερδιήθησης είναι οι μοναδικές ικανότητες διαχωρισμού, η μικρή κατανάλωση ενέργειας και η ευελιξία στις θερμοκρασίες λειτουργίας. Οι εγκαταστάσεις υπερδιήθησης μπορούν να λειτουργήσουν από σχεδόν 0 °C έως ~80 °C, ανάλογα με την ευαισθησία του διαλύματος στη θερμότητα, και το υλικό των μεμβρανών (Gekas et al., 1993).

Κυρίως δύο τύποι λειτουργίας χρησιμοποιούνται ευρέως στα συστήματα υπερδιήθησης: η μέθοδος της εφαπτομενικής τροφοδοσίας (cross flow) και η μέθοδος της κάθετης ή κατά μέτωπο τροφοδοσίας (dead end). Και στις δύο περιπτώσεις δρώσα δύναμη είναι η πίεση, όπου στην πρώτη περίπτωση η εφαρμοζόμενη πίεση οδηγεί το διάλυμα τροφοδοσίας εφαπτομενικά της μεμβράνης (με ανακυκλοφορία της τροφοδοσίας), ενώ στη δεύτερη περίπτωση το διάλυμα οδηγείται απ' ευθείας κάθετα στη μεμβράνη (χωρίς ανακυκλοφορία). Στις βιομηχανίες προτιμάται κυρίως η μέθοδος εφαπτομενικής τροφοδοσίας (cross flow), η οποία έχει ως στόχο τον περιορισμό των εναποθέσεων υλικού πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης, ώστε να καθυστερεί η υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης (fouling) (Γκέκας & Μπαλτά, 2005, Gekas et al., 1993).

# 4.4. Εφαρμογή των μεμβρανών υπερδιήθησης στα αγρο-βιομηχανικά απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων

Οι διεργασίες που ακολουθούνται στις βιομηχανίες τροφίμων έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων παραπροϊόντων (αποβλήτων). Κάθε χρόνο συσσωρεύονται ολοένα και περισσότερα αγρο-βιομηχανικά απόβλητα που παράγονται από βιομηχανίες άλεσης, ζυθοποιίας και ζάχαρης στην Ευρώπη. Προς το παρόν, τα μεγαλύτερα τμήματα των παραπροϊόντων διατίθενται ως ζωοτροφές. Ωστόσο, παρατηρείται συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον από τους ακαδημαϊκούς ερευνητές, καθώς και από τους ερευνητές των βιομηχανιών να ανακτήσουν συστατικά υψηλής θρεπτικής αξίας που περιέχονται στα απόβλητα (Persia et al., 2003, Shahidi et al., 2007), τα οποία μπορούν να μετασχηματιστούν σε "λειτουργικά τρόφιμα" (Faulds et al., 1997, Laufenberg et al., 2003).

Η τεχνολογία των μεμβρανών υπερδιήθησης (UF) είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, η οποία έχει εφαρμοστεί επιτυχώς τις τελευταίες τρεις δεκαετίες στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και σε βιομηχανικές εφαρμογές για την επεξεργασία ποικίλων υποστρωμάτων, όπως γαλακτοκομικών προϊόντων, προϊόντων με βάση τα δημητριακά, αλλά και αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων (Gekas et al., 1998, Señorans et al., 2003). Συγκεκριμένα στη βιομηχανία τροφίμων έχει καταφέρει να δώσει λύσεις σε πολλά προβλήματα ή ακόμη και να αντικαταστήσει παλαιότερες τεχνολογίες οι οποίες μπορεί να μην ήταν τόσο αποτελεσματικές. Οι τυπικές διεργασίες υπερδιήθησης αφορούν το διαχωρισμό μακρομορίων που περιέχονται στις τροφές  $(\pi.\chi.$  διαιτητικών ινών) από μικρότερα συστατικά  $(\pi.\chi.$  σάκχαρα, ιόντα) με απώτερο σκοπό την ανάκτηση αυτών, ή την απομόνωσή τους από ένα απόβλητο. Χαρακτηριστικά, μεμβράνες υπερδιήθησης και κεραμικές μεμβράνες έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για την κλασματοποίηση αδιάλυτων φυτικών ινών (λιγνίνη, κυτταρίνη), αφού είχαν προ-επεξεργαστεί σε αλκαλικό περιβάλλον (Toledano et al., 2010a, b) ή με επεξεργασία με οργανικούς διαλύτες π.χ. αιθανόλη (Alriols et al., 2010). Ομοίως, και οι διαλυτές ίνες έχουν επεξεργαστεί με τη διεργασία των μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, οι Sulaiman et al. (2001) εφάρμοσαν μία πιλοτική μονάδα υπερδιήθησης εφαπτομενικής ροής, για το διαχωρισμό μιγμάτων πηκτίνηςγλυκόζης χρησιμοποιώντας μία μεμβράνη πολυαιθεροσουλφόνης. Πιο πρόσφατα, οι Galanakis et al. (2010a), χρησιμοποίησαν μία πιλοτική μονάδα υπερδιήθησης εφαπτομενικής ροής, προκειμένου να μελετήσουν το διαχωρισμό μιγμάτων πηκτινών-καλίου. Το διάλυμα τροφοδοσίας στα πειράματά τους προερχόταν από απόβλητα ελαιουργείου, και ο διαχωρισμός

επιτεύχθηκε με εφαρμογή μίας μεμβράνης υπερδιήθησης από πολυσουλφόνη. Επιπλέον, οι Ni et al. (2009) ανέκτησαν τις υδατοδιαλυτές α-γλουκάνες από ένα εκχύλισμα από ρίζες (*Rubus crataegifolius* Bge.), εφαρμόζοντας διαδοχική επεξεργασία με ζεστό νερό, επώαση με ένζυμα και υπερδιήθηση.

Η βρώμη συμπεριλαμβάνεται στα δημητριακά που περιέγουν υψηλά ποσοστά υδατοδιαλυτών διαιτητικών ινών (2,2-7,8 g β-γλυκάνης/100 g) και πρωτεϊνών ανώτερης θρεπτικής αξίας (15-20 g/100 g) (Webster, 2002, Lazaridou et al., 2007). Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το δημητριακό της βρώμης στην ανθρώπινη υγεία, σχετίζονται με τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης και γενικότερα με την καταπολέμηση χρόνιων ασθενιών (Braaten et al., 1994, Andersson et al., 2010) (εκτενής αναφορά στο Κεφ. 3). Συνεπώς, η αποδοχή των β-γλυκανών της βρώμης ως βιοενεργά συστατικά έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τροφίμων ως προς την ανάπτυξη λειτουργικών προϊόντων τροφίμων, εμπλουτισμένων με υψηλά ποσοστά βγλυκανών (Lazaridou et. al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, η βρώμη έχει χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή μη-γαλακτοκομικών προϊόντων (γάλα βρώμης), κατόπιν της διαδικασίας της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου. Η παραπάνω διεργασία συντελεί στο σχηματισμό του τελικού προϊόντος, του γάλακτος βρώμης (Lindahl et al., 1995). Ωστόσο παράγει και ένα παραπροϊόν (στερεό υπόλειμμα), το οποίο συνήθως ξηραίνεται και διατίθεται ως ζωοτροφή. Τα στάδια που ακολουθούνται κατά την παραγωγή γάλακτος βρώμης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2. Το συγκεκριμένο διάγραμμα ροής προέκυψε με εφαρμογή του λογισμικού προγράμματος SuperPro Designer®, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς διευκολύνει η μοντελοποίηση, την αξιολόγηση και τη βελτιστοποίηση ολοκληρωμένων διεργασιών σε ένα ευρύ πεδίο βιομηγανικών εφαρμογών (Γκέκας & Μπαλτά, 2005). Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, το απόβλητο προκύπτει από τη φάση του διαχωριστήρα (centrifugation).



Σχήμα 4.2. Παρουσίαση των σταδίων που ακολουθούνται στη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης, με χρήση του λογισμικού προγράμματος SuperPro Designer®.

Μέχρι στιγμής δεν έχουν διεξαχθεί έρευνες που να αφορούν την ανάκτηση των β-γλυκανών από τα απόβλητα βιομηχανιών βρώμης με εφαρμογή της διεργασίας της υπερδιήθησης. Επιπρόσθετα, οι θεμελιώδεις γνώσεις που αφορούν τη συμπεριφορά αλλά και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των διαλυμάτων β-γλυκάνης σε εφαρμογές διαχωρισμού μεμβρανών, είναι ελλιπείς και περιορισμένες (Pinelo et al., 2009). Οι Lazaridou et al. (2008) έχουν μελετήσει την κλασματοποίηση των β-γλυκανών σε ένα υδρόλυμα, χρησιμοποιώντας μια διάταξη φυγοκεντρικής υπερδιήθησης. Το υδρόλυμα προέκυψε κατόπιν αποικοδόμησης του αδιάλυτου κλάσματος των κυτταρικών τοιχωμάτων του κριθαριού με ένα ενζυμικό εκχύλισμα. Επομένως, η κλασματοποίηση επέφερε αρκετά χαμηλά επίπεδα μοριακού βάρους (3kDa), άρα και χαμηλές τιμές "μοριακού κατωφλιού" (MWCO), με αποτέλεσμα να εφαρμοστεί η διεργασία της υπερδιήθησης για χαρακτηρισμό των δειγμάτων. Η φυγοκεντρική υπερδιήθηση ακολουθούσε την αρχή του συστήματος κάθετης ροής, όπου η φυγόκεντρος δύναμη (αντί της πίεσης) οδηγεί τους διαλύτες και τις διαλυμένες ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους κάθετα διαμέσου της

#### ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΤΑ ΑΓΡΟ-ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ 37

μεμβράνης. Ωστόσο, το σύστημα κάθετης ροής (συνεχούς ή διαλείποντος έργου) είναι περισσότερο διαδεδομένο για κατάντη επεξεργασία, κυρίως όταν η ενζυμική αντίδραση και η διήθηση συμβαίνουν ταυτόχρονα. Σε αυτή την περίπτωση, απαιτείται ανάδευση με σκοπό να μειώσει το φαινόμενο πόλωσης συγκέντρωσης στο επάνω τμήμα της μεμβράνης και να βελτιώσει την ταχύτητα της αντίδρασης στη φάση της τροφοδοσίας (Pinelo et al., 2009). Το φαινόμενο πόλωσης συγκέντρωσης θα μπορούσε να είναι περισσότερο έντονο εάν οι βγλυκάνες δεν είχαν υδρολυθεί και ήταν υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο θα προκαλούσε αύξηση στο ιξώδες του διαλύματος (Lazaridou et al., 2007). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί, ότι οι μεγάλου μοριακού βάρους β-γλυκάνες βρώμης επιδεικνύουν προηγμένες ιδιότητες πηκτής (Lazaridou et al., 2003). Οι υδατοδιαλυτές ίνες, για το λόγο ότι έχουν ιδιότητες πηκτής, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην τεχνολογία τροφίμων για την ικανότητά τους να ελαττώνουν την πρόσληψη λίπους από τηγανητά προϊόντα κρέατος με υψηλά ποσοστά λιπαρών (Galanakis et al., 2010b). Η υπερδιήθηση εφαπτομενικής ροής αποτελεί ένα σύστημα το οποίο δύναται να εφαρμοστεί εναλλακτικά σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπου η ροή της τροφοδοσίας κατευθύνεται παράλληλα προς την επιφάνεια της μεμβράνης με ανακυκλοφορία (Gekas et al., 1993, Pinelo et al., 2009).

# **ΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Το πειραματικό μέρος μπορεί να διαχωριστεί σε δύο επιμέρους τμήματα: το ένα τμήμα (Κεφάλαιο 5) αφορά τη διαδικασία παραγωγής γάλακτος από βρώμη, μελετώντας τις κινητικές ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης σε εργαστηριακή κλίμακα, και το δεύτερο τμήμα (Κεφάλαιο 6) αφορά την περιβαλλοντική διαχείριση του στερεού αποβλήτου βρώμης, με στόχο την ανάκτηση πολύτιμων θρεπτικών συστατικών (β-γλυκανών) που εμπεριέχονται σε αυτό.

Πιο αναλυτικά, σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα στο Lund της Σουηδίας, στο Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, σε συνεργασία με τη σουηδική εταιρεία OATLY AB, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Rickard Öste και Björn Bergenståhl. Μελετήθηκε η κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης, σε εργαστηριακή κλίμακα. Η μαλτόζη προσδιορίστηκε (εμμέσως) στα υδρολύματα, με χρήση εμπορικού ενζυμικού κυτίου γλυκόζης, προκειμένου να γίνει μια πρώτη εκτίμηση της καταλυτικής δράσης των υδρολυτικών ενζύμων (α-αμυλάση και β-αμυλάση), καθώς και των μηχανισμών αλληλεπίδρασης/συνέργειας που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο ενζύμων.

Μια δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον καθηγητή Μπιλιαδέρη Κ., και τη λέκτορα Λαζαρίδου Α., στο Εργαστήριο του Τομέα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Γεωπονικής Σχολής στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Μελετήθηκε η κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης, όπως και στα προκαταρκτικά πειράματα, με τη διαφορά ότι στα υδρολύματα προσδιορίστηκαν οι ολιγοσακχαρίτες (γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη) με τη μέθοδο Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC). Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ρεολογίας, τα οποία διαχωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: α) μελέτη του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου, β) μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των υδρολυμάτων των αλεύρων βρώμης, και γ) λήψη μηχανικών φασμάτων κάτω από δυναμικές συνθήκες στα υδρολύματα. Επίσης, πρόσθετες ιδιότητες που μετρήθηκαν παράλληλα ήταν η συγκέντρωση των β-γλυκανών, του ολικού αμύλου (πριν και μετά την υδρόλυση) καθώς και το χρώμα των υδρολυμάτων.

Το δεύτερο τμήμα του πειραματικού μέρους (Κεφάλαιο 6) αφορά τη διαχείριση του στερεού αποβλήτου βρώμης, το οποίο λαμβάνεται σε ένα από τα τελικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας στη βιομηχανία. Στη φάση του διαχωριστήρα (decanter), λαμβάνεται το τελικό προϊόν, το γάλα βρώμης, και ένα στερεό υπόλειμμα, το οποίο αποτελεί το παραπροϊόν της παραγωγικής διαδικασίας. Το παραπροϊόν της διεργασίας, προς το παρόν, παρέχεται ως ζωοτροφή στις κτηνοτροφικές μονάδες αφού υποστεί μερική ξήρανση. Ωστόσο, κάποιο μικρό ποσοστό διαιτητικών ινών (διαλυτών και αδιάλυτων) περιέχεται σε αυτό, και σκοπός είναι να ανακτηθούν χρησιμοποιώντας τη διεργασία των μεμβρανών υπερδιήθησης. Αρχικά, το στερεό απόβλητο υπέστη κάποια προ-επεξεργασία (εκχύλιση σε βασικό περιβάλλον με στόχο τη διαλυτοποίηση των διαλυτών β-γλυκανών), και στη συνέχεια το προκύπτον διάλυμα εφαρμόστηκε σε μια πιλοτική μονάδα εφαπτομενικής ροής, χρησιμοποιώντας μεμβράνες ενός τύπου, αλλά σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, το οποίο εφαρμόστηκε στην ίδια πιλοτική μονάδα όπως και το απόβλητο βρώμης, αλλά επίσης και σε μία μονάδα κάθετης ροής μικρότερης κλίμακας (αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης) όπου εξετάστηκαν διαφορετικοί τύποι μεμβρανών. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα μελετήθηκαν οι παράμετροι απόδοσης και οι συντελεστές συγκράτησης σε ένα εύρος τιμών δια-μεμβρανικής πίεσης, με απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίση της διεργασίας της υπερδιήθησης των β-γλυκανών, για την ανάκτηση αλλά και το διαγωρισμό τους από το στερεό απόβλητο βρώμης.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν (Κεφάλαια 5 & 6) αναφέρονται λεπτομερώς οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς επίσης και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ι

# 5.1. Υλικά

Η βρώμη (Avena sativa) που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης ήταν υπό μορφή σπόρων που είχαν υποστεί υγροθερμική επεξεργασία, στους 100 °C για μερικά λεπτά, η οποία λήφθηκε απ' ευθείας από την εταιρεία OATLY AB (Landskrona, Σουηδία). Η άλεση μικρών ποσοτήτων βρώμης πραγματοποιήθηκε σε έναν μύλο του καφέ (οικιακής χρήσης) και η κλασμάτωση του αλεύρου έγινε με μία σειρά από κόσκινα τα οποία ήταν προσαρμοσμένα σε μία συσκευή δόνησης (Retac 3D, Γερμανία). Προέκυψαν τρία κοκκομετρικά κλάσματα με μέγεθος μορίων >500 μm, μεταξύ 500 μm και 250 μm, και <250 μm. Για τα προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν νιφάδες βρώμης σε εμπορική συσκευασία (εταιρεία: AXA). Οι νιφάδες αλέστηκαν σε μύλο άλεσης (εργαστηριακής κλίμακας) χρησιμοποιώντας κόσκινο με μέγεθος πόρων ίσο με 0,5 mm, χωρίς να γίνει περαιτέρω διαχωρισμός σε μικρότερα κοκκομετρικά κλάσματα.

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού και αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstand, Germany) και τη Sigma-Aldrich Co. (Gillingham, Dorset). Η προμήθεια των πρότυπων διαλυμάτων (standards) για τη χρωματογραφική ανάλυση (γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη) έγινε από τη Sigma, ενώ το διπλά απιονισμένο νερό (water for chromatography) όπως επίσης και το ακετονιτρίλιο (βαθμού καθαρότητας για HPLC), από την εταιρεία Merck.

Η προμήθεια των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της β-γλυκάνης (K-BGLU), του ολικού αμύλου (K-TSTA) και της γλυκόζης (K-GLUC) έγινε από την εταιρεία Megazyme (Megazyme, Ireland), και ήταν τα παρακάτω: λιχενάση (1000 U/mL), β-γλυκοσιδάση (40 U/mL), θερμοανθεκτική α-αμυλάση (3000 U/mL), αμυλογλυκοσιδάση (200 U/mL) και α-γλυκοσιδάση (μαλτάση) (680 U/mL).

# 5.2. Υδρολυτικά ένζυμα

Τα υδρολυτικά ένζυμα, α-αμυλάση και β-αμυλάση, λήφθηκαν επίσης από τη σουηδική εταιρεία OATLY AB. Πρόκειται για δύο βιομηχανικά σκευάσματα, τα οποία σύμφωνα με προδιαγραφές της εταιρείας χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό· α-αμυλάση (0,208 FAU/g βρώμης επί ξηρού) και β-αμυλάση (2,85 °L/g βρώμης επί ξηρού), όπου η αναλογία α-αμυλάσης:β-αμυλάσης ήταν ίση με 1:20. Πραγματοποιήθηκαν και πειράματα μελετώντας τη δράση της (α) α-αμυλάσης με τιμή ενεργότητας ίση με 4,165 FAU/g αλεύρου βρώμης επί ξηρού, και της (β) β-αμυλάσης με τιμή ενεργότητας ίση με 3°L/g αλεύρου βρώμης επί ξηρού, χωριστά. Τόσο οι ποσότητες όσο και οι αναλογίες των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σύμφωνες με τις προδιαγραφές της εταιρείας.

Για τα προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν υδρολυτικά ένζυμα που αγοράστηκαν από την εταιρεία Megazyme, και συγκεκριμένα α-αμυλάση από Aspergillus oryzae (E-ANAAM, 1000 U/mL) και β-αμυλάση από κριθάρι (E-BARBL, 20000 U/mL). Τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν επίσης σε τρεις αναλογίες στα πειράματα, και συγκεκριμένα, πειράματα: (α) μόνο με α-αμυλάση με τιμή ενεργότητας ίση με 2U/g αλεύρου βρώμης επί ξηρού, (β) μόνο με βαμυλάση με τιμή ενεργότητας ίση με 40 U/g αλεύρου βρώμης επί ξηρού, και (γ) με α-αμυλάση και β-αμυλάση σε συνδυασμό, με τιμές ενεργότητας 0,1 U/g και 38 U/g αλεύρου βρώμης επί ξηρού, αντίστοιχα. Στην περίπτωση (γ), η αναλογία α-αμυλάσης:β-αμυλάσης ήταν ίση με 1:20. Οι τιμές των ενεργοτήτων των ενζύμων προσδιορίστηκαν σύμφωνα με ενζυμικά κυτία προσδιορισμού ενεργότητας της εταιρείας Megazyme (κωδικός:E-ANAAM για την α-αμυλάση, κωδικός :E-BARBL για την β-αμυλάση).

# 5.3. Ενζυμική υδρόλυση αλεύρου βρώμης

Τα άλευρα αναμίχθηκαν με απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 10% (w/w, επί ξηρού), υπό συνεχή ανάδευση στους 65 °C (pH 6,4 – 6,6). Το υδατικό αιώρημα βρώμης (200 mL) τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο και επωάστηκε μαζί με το ένζυμο (ή τα ένζυμα) που προστέθηκε, στους 60 °C, υπό συνεχή μηχανική ανάδευση (Tamro, IKA® WORKS, Type: RW20.N, Wilmington, NC, US) σε 330 rpm. Η ενζυμική υδρόλυση διήρκεσε 3 ώρες και η δειγματοληψία (λήψη ποσότητας 5 mL) πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και πιο συγκεκριμένα, μετά από: 2, 4, 8, 16, 32, 45, 64, 90, 120, 150 και 180 λεπτά, αφότου ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση. Για την απενεργοποίηση της δράσης των ενζύμων, 20 mL βραστού νερού

προστίθεντο κάθε φορά στη γυάλινη φιάλη με τα 5 mL του δείγματος, και το αραιωμένο διάλυμα μεταφερόταν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 10 λεπτά. Η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης του υδατικού αιωρήματος βρώμης πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν, για το συνολικό (αρχικό) άλευρο βρώμης, καθώς και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα που προέκυψαν με το κοσκίνισμα.

Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε εναλλακτικά και με τρόπο όπου τη δράση του ενός ενζύμου διαδεχόταν η δράση του άλλου (δοκιμαστικά). Πιο συγκεκριμένα, η ενζυμική αντίδραση ξεκινούσε μόνο με την προσθήκη της α-αμυλάσης (4,16 FAU/ 20g βρώμης επί ξηρού) και γινόταν η επώαση του υδατικού αιωρήματος βρώμης σε υδατόλουτρο στους 60 °C για μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας, ακολουθούσε η προσθήκη της β-αμυλάσης (57 °L/ 20 g βρώμης επί ξηρού), και η αντίδραση συνεχιζόταν για δύο επιπλέον ώρες.

Επιπρόσθετα, θέλοντας να προσομοιάσουμε περαιτέρω την ενζυμική υδρόλυση δύο σταδίων διαδικασία παραγωγής γάλακτος από βρώμη- που πραγματοποιείται στην εταιρεία OATLY AB [όπου ένα σύντομο και απότομο στάδιο θέρμανσης με ατμό (steaming) παρεμβάλλεται μεταξύ δύο σταδίων ενζυμικής υδρόλυσης], έγινε δοκιμαστικά το παρακάτω πείραμα: το υδατικό αιώρημα αλεύρου βρώμης υπέστη αρχικά υδρόλυση (στους 60 °C, για μία ώρα) λόγω της παράλληλης δράσης της α-αμυλάσης (0,208 FAU/g βρώμης επί ξηρού) και της β-αμυλάσης (2,85 °L/g βρώμης επί ξηρού), έπειτα η φιάλη στην οποία γινόταν η ενζυμική αντίδραση εμβαπτίσθηκε σε υδατόλουτρο στους 95–100 °C για 15 λεπτά, και τέλος ακολούθησε ένα δεύτερο στάδιο υδρόλυσης, όμοιο με το πρώτο. Το συγκεκριμένο πείραμα, όπως και το προηγούμενο (διαδοχική δράση δύο αμυλασών) πραγματοποιήθηκαν μόνο για το συνολικό (αρχικό) άλευρο βρώμης, όχι και για τα τρία κλάσματα.

# 5.4. Καθαρισμός των δειγμάτων (υδρολυμάτων) – Εκχύλιση των ολιγοσακχαριτών

Ο καθαρισμός των δειγμάτων (υδρολυμάτων) και η εκχύλιση των ολιγοσακχαριτών για τον ποσοτικό τους προσδιορισμό περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 5.1), σύμφωνα με τους Granito M. et al. (2002) και Hatzikamari M. et al. (2007).



Σχήμα 5.1. Καθαρισμός δειγμάτων (υδρολυμάτων) και εκχύλιση ολιγοσακχαριτών.

Πρόκειται για μία διαδικασία η οποία αποσκοπεί στην απομάκρυνση των σακχάρων μεγάλου μοριακού βάρους (μη-υδρολυμένο άμυλο, δεξτρίνες, β-γλυκάνες), αλλά και άλλων συστατικών, όπως λιπαρών ουσιών, πρωτεϊνών, ιόντων μετάλλων, κ.ά. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν να προκύψει ένα τελικό δείγμα, αποτελούμενο κυρίως από διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους.

Αρχικά, η προσθήκη αιθανόλης απομάκρυνε τους μεγάλου μοριακού βάρους υδατάνθρακες, οι οποίοι κατακρημνίστηκαν και σχημάτισαν ίζημα, το οποίο στη συνέχεια αφαιρέθηκε με το φιλτράρισμα. Έπειτα, ο αιθέρας συγκράτησε και απομάκρυνε τις λιπαρές ουσίες που περιέχονταν στα υδρολύματα, και τέλος οι ρητίνες, είναι φορτισμένες, γι' αυτό και βοήθησαν στην απομάκρυνση πρωτεϊνών, αλάτων και ιχνοστοιχείων, τα οποία είναι ιονισμένα. Κατόπιν αυτής της επεξεργασίας, ακολούθησε ο προσδιορισμός των ολιγοσακχαριτών.

# 5.5. Προσδιορισμός Ολιγοσακχαριτών στα Υδρολύματα

# 5.5.1. <u>Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)</u>

Τα επεξεργασμένα δείγματα αναλύθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολιγοσακχαρίτες (γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη), μέσω συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), που βρίσκεται στο Εργαστήριο του Τομέα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, της Γεωπονικής Σχολής του ΑΠΘ. Ποσότητα ίση με 1 mL επεξεργασμένου δείγματος διαλυτοποιείται με 1,5 mL διπλά απιονισμένου νερού (βαθμού HPLC, Merck) και 7,5 mL ακετονιτριλίου (βαθμού χρωματογραφίας, Merck), και το αραιωμένο δείγμα φιλτράρεται με φίλτρα μεμβράνης με διάμετρο πόρων ίση με 0,2 μm (polyamide, Whatman). Έπειτα, 20 μL του διηθήματος εγχύονταν στον χρωματογράφο HPLC-RI και εκλούονταν ισοκρατικά με ρυθμό ροής 0,9 mL min<sup>-1</sup>, σε θερμοκρασία 40 °C. Το σύστημα αποτελείται από μία αντλία Marathon IV HPLC (Rigas Labs., Θεσσαλονίκη, Ελλάδα), ένα χειροκίνητο σύστημα έγχυσης δείγματος με βρόχο των 20 μL, έναν μονωμένο φούρνο (insulated column oven), καθώς και από έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI), (model ERC-7515A, ERC. Inc. Nishiaoki, Kawaguchi-City, Japan). Μία μ-Bondapak στήλη (amino-bonded column) (3.9 mm  $\times$  30 cm, διάμετρος πόρων: 10 μm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) συνδεδεμένη κατά μήκος με μία μ-Bondapak-NH<sub>2</sub> προ-στήλη (3.9  $\times$  20 mm, Waters Corporation) χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα του υγρού χρωματογράφου. Η κινητή φάση ήταν ένα μίγμα ακετονιτριλίου και διπλά απιονισμένου νερού σε αναλογία (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O), 75:25, το οποίο φιλτράρονταν υπό κενό με nylon μεμβράνες με διάμετρο πόρων ίση με 0,45 μm, και η αέρια φάση ήταν το ήλιο· ο ρυθμός ροής ήταν ίσος με 0,9 mL min<sup>-1</sup>, ο χρόνος ανάλυσης ίσος με 30 λεπτά, και η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή, στους 40 °C. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα (standards) σακχάρων (γλυκόζη, μαλτόζη, λακτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη, Sigma) για τη βαθμονόμηση της αναλυτικής μεθόδου, σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις,

κατόπιν αραίωσής τους στην κινητή φάση. Η λακτόζη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό standard (internal standard), καθότι δεν περιέχεται στους σπόρους βρώμης, και επιπρόσθετα εμφανίζεται ως κορυφή (οξεία) με υψηλή διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με τους άλλους ενδογενείς ολιγοσακχαρίτες. Η ποσοτικοποίηση του κάθε σακχάρου (γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μαλτοτετραόζη) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, του λογισμικού ChromQuest (ThermoQuest Inc., San Jose, CA).

# 5.5.2. Ανάλυση με χρήση ενζυμικού κυτίου γλυκόζης

Ο προσδιορισμός μαλτόζης στα προκαταρκτικά πειράματα έγινε με τη μέθοδο του Trinder (1969), με χρήση ενός ενζυμικού κυτίου γλυκόζης, το οποίο αγοράστηκε από την εταιρεία Megazyme (K-GLUC). Η παραγόμενη μαλτόζη στα υδρολύματα μετρήθηκε εμμέσως, και πιο συγκεκριμένα, η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δράση του ενζύμου της α-γλυκοσιδάσης, το οποίο διασπά το δισακχαρίτη της μαλτόζης και παράγει γλυκόζη. Βέβαια, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στον προσδιορισμό της συνολικής γλυκόζης συμπεριλαμβάνεται και η ελεύθερη γλυκόζη που υπάρχει εξ αρχής στο υδρόλυμα. Πιο συγκεκριμένα, μικροποσότητα (100 μL) αραιωμένου υδρολύματος σε απιονισμένο νερό αναμιγνύεται με ίση ποσότητα αραιωμένου ενζύμου α-γλυκοσιδάσης σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (imidazol buffer, pH 6.0), και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex mixer) και επώαση στους 40 °C για 20 min. Επειτα προστίθενται 3 mL του αντιδραστηρίου οξειδάσης/υπεροξειδάσης της γλυκόζης της επώασης, και αφού τα δείγματα κρυώσουν (θερμοκρασία περιβάλλοντος, 25 °C), μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος.

# 5.6. Ρεολογικές ιδιότητες

Φρέσκα δείγματα υδατικού αιωρήματος βρώμης προετοιμάστηκαν με συνεχή ανάμιξη των αλεύρων (του συνολικού και των τριών κλασμάτων) με απιονισμένο νερό (10% w/w), έως πλήρους διασποράς τους. Η ρεολογική συμπεριφορά και οι ιξωδοελαστικές τους ιδιότητες, καθώς επίσης και η μεταβολή του ιξώδους συναρτήσει του χρόνου υπό σταθερό ρυθμό διάτμησης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός περιστρεφόμενου Physica MCR300 ιξωδόμετρου (Physica Messtechnic GmbH, Stuttgart, Germany). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η γεωμετρία κυλίνδρου (διπλού ανοίγματος) (εσωτερικό και εξωτερικό άνοιγμα 0,42 και 0,47 mm, αντίστοιχα) και του ομόκεντρου κυλίνδρου (διάμετρος κυλίνδρου και περιστρεφόμενου εμβόλου, 28,92 και 26,66 mm, αντίστοιχα). Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν με ένα ελεγχόμενο σύστημα peltier (TEZ 150P/MCR) με ακρίβεια  $\pm$  0,1 °C και ένα υδατόλουτρο με σύστημα κυκλοφορίας νερού (Paar Physica). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις ρεολογικές μετρήσεις αναλύθηκαν με το υποστηριζόμενο λογισμικό (US200 V2.21).

Τρία είδη ρεολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκαν: (α) η μεταβολή του ιξώδους συναρτήσει του χρόνου, για το υδατικό αιώρημα βρώμης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης των αλεύρων (συνολικού αλεύρου και τριών κλασμάτων) σε ρυθμό διάτμησης ίσο με 200s<sup>-1</sup> χρησιμοποιώντας τη γεωμετρία του ομόκεντρου κυλίνδρου, (β) η ρεολογική συμπεριφορά των υδρολυμάτων των αλεύρων βρώμης (συνολικό άλευρο και τρία κλάσματα) μετρώντας το φαινομενικό ιξώδες (η) σε ένα εύρος ρυθμού διάτμησης, από 0,01 έως 1000 s<sup>-1</sup>, στους 25 °C, και για ορισμένα δείγματα (συνολικό άλευρο και χονδρόκοκκο κλάσμα με μέγεθος πόρων>500μm) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (10-50 °C), όπου πριν πραγματοποιηθούν οι ρεολογικές δοκιμές, όλα τα υδρολύματα φυγοκεντρήθηκαν (10min σε 615 × g) και οι προσδιορισμοί του ιξώδους έγιναν στα υπερκείμενα στρώματα· η γεωμετρία κυλίνδρου (διπλού ανοίγματος) χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάλυση, και (γ) μηχανικά φάσματα κάτω από δυναμικές συνθήκες στα υδρολύματα (1 ώρα υδρόλυσης, 60 °C), όπου προσδιορίστηκαν το G' (συνιστώσα ελαστικότητας), το G'' (ιξώδης συνιστώσα) και το  $\eta^*$  (σύνθετο ιξώδες) σε ένα εύρος συχνοτήτων (0,1-100Hz) στους 25 °C με παραμόρφωση ίση με 0,1%. Τα δείγματα (συνολικό άλευρο και τρία κλάσματα) αρχικά φυγοκεντρήθηκαν (10min σε 615 × g) και ακολούθησαν δυναμικές ρεολογικές δοκιμές στα υπερκείμενα στρώματα. Μια λεπτή επίστρωση ελαίου παραφίνης κάλυπτε την επιφάνεια των δειγμάτων με σκοπό την αποφυγή της εξάτμισης κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Όλες οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ένα τεστ για την ανίχνευση της υπολειμματικής ενεργότητας της β-γλουκανάσης στα βιομηχανικά σκευάσματα (α-αμυλάσης και β-αμυλάσης), εξετάζοντας το ιξώδες σε ένα διάλυμα καθαρής β-γλυκάνης (1% w/w). Πιο συγκεκριμένα, το ιξώδες παρακολουθούνταν στα 200s<sup>-1</sup> συνεχώς, στους 60 °C για μία ώρα, αφού είχε προηγηθεί η προσθήκη των δύο αμυλολυτικών βιομηχανικών σκευασμάτων στο διάλυμα. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινομενικό ιξώδες (η) μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius :

 $\eta = \eta_0 \ e^{(E_a/RT)}$ 

όπου η είναι το ιξώδες σε θερμοκρασία T,  $\eta_0$  ο συντελεστής Arrhenius,  $E_{\alpha}$  η ενέργεια ενεργοποίησης για τη ροή, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

# 5.7. Προσδιορισμός χρώματος

Οι παράμετροι χρώματος L\*, a\* και b\* εκτιμήθηκαν για τα υπερκείμενα στρώματα των υδρολυμάτων υδατικού αιωρήματος βρώμης χρησιμοποιώντας Χρωματόμετρο (CR-400/410 KONICA MINOLTA). Η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε για μία ώρα υπό την ταυτόχρονη δράση των δύο υδρολυτικών ενζύμων (στις συνθήκες που περιγράφηκαν στις παραγράφους 5.2. και 5.3), για το συνολικό άλευρο βρώμης και τα τρία κλάσματά του. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα υδρολύματα φυγοκεντρήθηκαν (10min σε 615 × g) και τα υπερκείμενα στρώματά τους χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του χρώματος.

# 5.8. Προσδιορισμός β-γλυκανών

Οι περιεχόμενες β-γλυκάνες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των McCleary και Glennie-Holmes (1985) χρησιμοποιώντας το εμπορικό κυτίο της εταιρείας Megazyme (mixed linkage β-glucan assay kit, K-BGLU). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται σε πρώτη φάση στην υδρόλυση των β- $(1 \rightarrow 4)$ -D-γλυκοζιτικών δεσμών που περιέχονται στις β-γλυκάνες με τη δράση του ενζύμου της λιχενάσης, και σε δεύτερη φάση, στην πλήρη υδρόλυση προς γλυκόζη, με τη δράση του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης. Οπότε, η περιεχόμενη β-γλυκάνη προσδιορίζεται μέσω της παραγόμενης D-γλυκόζης, με χρήση του αντιδραστηρίου οξειδάσης/υπεροξειδάσης της γλυκόζης (GOPOD reagent). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος.

Πιο συγκεκριμένα, 400mg στερεού δείγματος (υπό μορφή σκόνης) τοποθετήθηκαν σε γυάλινο σωλήνα των 50 mL και διαποτίστηκαν με 1 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50% v/v). Ακολούθησε προσθήκη 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος (sodium phosphate buffer, 20mM) σε pH

6.5 και έντονη ανάδευση σε vortex mixer. Το προκύπτον διάλυμα επωάστηκε στους 100  $^{\circ}$ C για 5 min (με μία ενδιάμεση έντονη ανάδευση) και στη συνέχεια αφού τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40 °C (για 5-10 min), προστέθηκαν 0,2 mL του ενζύμου λιγενάσης (10U) και το μίγμα αναδεύτηκε έντονα, και επωάστηκε για 1 h σε υδατόλουτρο στους 40 °C. Ο όγκος σε κάθε σωλήνα ρυθμίστηκε στα 30 mL με προσθήκη απιονισμένου νερού και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε 1000×g. Από το υπερκείμενο στρώμα λήφθηκαν τρεις ποσότητες ίσες με 0,1 mL η κάθε μία, και τοποθετήθηκαν σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες (των 15 mL). Στον έναν σωλήνα προστέθηκαν 0,1 mL ρυθμιστικού διαλύματος (sodium acetate buffer, 50mM) σε pH 4.0 (για μέτρηση της ελεύθερης γλυκόζης), ενώ στους άλλους δύο σωλήνες προστέθηκαν 0,1 mL του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης (0,2U). Οι τρεις σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 40 °C και επωάστηκαν για 15 min. Έπειτα, προστέθηκαν 3 mL του αντιδραστηρίου οξειδάση/υπεροξειδάση της γλυκόζης (GOPOD reagent) και επωάστηκαν για ακόμη 20 min στους 40 °C. Τέλος, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό αντί δείγματος. Η πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκε με ένα υδατικό διάλυμα γλυκόζης σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 25, 50, 75 και 100 mg/100 mL.

Ο παραπάνω προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε για το συνολικό άλευρο βρώμης καθώς και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα του αλεύρου, στη συγκέντρωση 10 % (w/w, επί ξηρού). Όπως προαναφέρθηκε στην αρχή της παραγράφου 5.3., το υδατικό αιώρημα βρώμης (200 mL) προέκυψε μετά από μηχανική ανάδευση στους 65 °C (για μερικά λεπτά). Έπειτα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των β-γλυκανών ακολούθησε κάποια προεργασία με ανταλλαγή του διαλύτη. Αρχικά, τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου συμπυκνώθηκαν (70-80 °C) σε τελικό όγκο 100 mL, και ακολούθησε προσθήκη αιθανόλης προς τελική συγκέντρωση 90 % (v/v) σε αιθανόλη, με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης των β-γλυκανών. Το προκύπτον μίγμα αφέθηκε στους 4 °C για 3 h προκειμένου να κατακρημνιστούν οι β-γλυκάνες, και ακολούθησε διήθηση (απλό διηθητικό χαρτί) υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν επιπλέον 400 mL αιθανόλης και το μίγμα διατηρήθηκε στους 4 °C για 16 ώρες. Αφού πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη διήθηση, προστέθηκε ποσότητα προπανόλης στο στερεό υπόλειμμα ίση με 200 mL και το μίγμα αναδευόταν για 16ώρες (25 °C). Στόχος της ανάδευσης με την προπανόλη ήταν να έρθουν σε διασπορά οι β-γλυκάνες και να αυξηθεί η διαλυτότητά τους μετά την ξήρανση. Έπειτα, ακολούθησε μία τελευταία διήθηση και η ποσότητα του δείγματος μαζί με το φίλτρο τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 40 °C, προκειμένου να εξατμιστεί
η προπανόλη και να ξηρανθεί το δείγμα. Το συμπαγές στερεό δείγμα που προέκυψε λειοτριβήθηκε (με αχάτη) ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως και να έχει τη μορφή λεπτής σκόνης. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα, όπου και διατηρήθηκε μέχρι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των β-γλυκανών.

#### 5.9. Προσδιορισμός ολικού αμύλου

Το ολικό άμυλο προσδιορίστηκε, χρησιμοποιώντας το εμπορικό κυτίο της Megazyme (total starch assay procedure, K-TSTA), ακολουθώντας τη μέθοδο του Anon (1987). Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε για το συνολικό άλευρο βρώμης καθώς και για τα τρία κλάσματα, όπως επίσης και για τα υδρολύματα αυτών. Πιο συγκεκριμένα, το υδατικό αιώρημα βρώμης (200 mL) προέκυψε μετά από μηχανική ανάδευση στους 65 °C, και επωάστηκε στους 60 °C για 3 h, κατόπιν της προσθήκης της α-αμυλάσης (4,16 FAU/ 20g βρώμης επί ξηρού) και β-αμυλάσης (57 °L/ 20 g βρώμης επί ξηρού), σε συνδυασμό. Η αδρανοποίηση των ενζύμων έγινε με προσθήκη βραστού νερού (400 mL) και επώαση στους 100 °C για 10 min. Στη συνέχεια, τα υδρολύματα επεξεργάστηκαν με ανταλλαγή του διαλύτη, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε πιο πάνω (τρίτη παράγραφος, υποκεφάλαιο 5.8.). Η αρχή της μεθόδου του ολικού αμύλου βασίζεται στην υδρόλυση του αμύλου σε δύο φάσεις. Αρχικά, το άμυλο υδρολύεται (α-αμυλάση) μερικώς και διαλυτοποιείται πλήρως. Σε δεύτερη φάση, οι αμυλοδεξτρίνες υδρολύονται σε γλυκόζη με τη δράση της αμυλογλυκοσιδάσης.

Πιο συγκεκριμένα, 100mg στερεού δείγματος (υπό μορφή σκόνης) τοποθετήθηκαν σε γυάλινο σωλήνα των 25 mL και διαποτίστηκαν με 0,2 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης (80% v/v). Ακολούθησε προσθήκη 3 mL αραιωμένου ενζύμου θερμοανθεκτικής α-αμυλάσης (30U) στο ρυθμιστικό διάλυμα (MOPS buffer, 50 mM) σε pH 7.0 και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex mixer. Το προκύπτον διάλυμα επωάστηκε στους 100 °C για 6 min (με έντονη ανάδευση ανά 2 min) και στη συνέχεια αφού τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 50 °C (για 5-10 min), προστέθηκαν 4 mL του ρυθμιστικού διαλύματος (sodium acetate buffer, 200mM) σε pH 4.5 και αμέσως μετά προστέθηκαν 0,1 mL του ενζύμου της αμυλογλυκοσιδάσης (20 U). Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα, και επωάστηκε για 30 min σε υδατόλουτρο στους 50 °C. Έπειτα μεταφέρθηκε σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, όπου απομακρύνθηκε όλο το περιεχόμενο δείγμα του σωλήνα με απιονισμένο νερό, και ο συνολικός όγκος ρυθμίστηκε στα 100 mL. Ποσότητες 1,5 με 2 mL λήφθηκαν από τη φιάλη, μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγκοκέντρησης των 15 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min σε 3000 rpm. Από το υπερκείμενο στρώμα λήφθηκε ποσότητα ίση με 0,1 mL, μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα των 15 mL, προστέθηκαν 3 mL του αντιδραστηρίου οξειδάση/υπεροξειδάση της γλυκόζης (GOPOD reagent) και το μίγμα αναδεύτηκε έντονα. Ακολούθησε επώαση για 20 min στους 50 °C. Τέλος, οι σωλήνες αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό αντί δείγματος. Η πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκε με ένα υδατικό διάλυμα γλυκόζης σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 25, 50, 75 και 100 mg/100 mL.

#### 5.10. Στατιστική ανάλυση

Από τις διάφορες επαναλήψεις (τουλάχιστον 3) κάθε μέτρησης υπολογίστηκε η "μέση τιμή ±τυπική απόκλιση", με τη βοήθεια του προγράμματος Excel (Windows XP 2007). Οι "στατιστικές διαφορές" μεταξύ κάποιων δειγμάτων υπολογίστηκαν με αποδεκτό επίπεδο πιθανότητας 5% ( $P \le 0.05$ ), συγκρίνοντας τα διαστήματα εμπιστοσύνης με τη χρήση του Fisher's LSD test (ANOVA, Minitab 14).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΙΙ

#### 6.1. Υλικά

Δείγμα αποβλήτου (Adavena F30, 7,5 kg) λήφθηκε από τη σουηδική εταιρεία OATLY AB (Landskrona, Sweden), το οποίο συλλέχθηκε από την έξοδο του διαχωριστήρα (στερεή φάση), τον Οκτώβριο του 2009. Από την υγρή φάση του διαχωριστήρα προέκυπτε το τελικό προϊόν, το γάλα βρώμης ενώ η στερεή («βαριά») φάση διατίθεντο απ' ευθείας ως ζωοτροφή στα χοιροστάσια, χωρίς επεξεργασία. Το φρέσκο δείγμα εστάλη κατεψυγμένο (-20 °C), όπως και συντηρήθηκε έως τη χρησιμοποίησή του. Πρόκειται για ένα συμπύκνωμα φυτικών ινών βρώμης, οι οποίες σε μεγάλο ποσοστό (75%) είναι αδιάλυτες. Η ακριβής χημική σύσταση του στερεού αποβλήτου παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 6.1):

Μουάδα	Σύσταση (%) του			
WIOVUOU	στερεού αποβλήτου			
g/100g	65			
g/100g	35			
g/100g	28			
kJ/kcal	4,2			
g/100g	9			
g/100g	5			
g/100g	6			
g/100g	2			
g/100g	4			
g/100g	13			
g/100g	3			
g/100g	2			
	Movάδα g/100g g/100g kJ/kcal g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g g/100g			

Πίνακας 6.1. Χημική σύσταση του στερεού αποβλήτου (Adavena F30), όπως δίνεται από την εταιρεία.

Πηγή: OATLY AB (Landskrona, Sweden)

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαχωρισμού των συστατικών από το στερεό απόβλητο της βιομηχανίας παραγωγής γάλακτος βρώμης είναι: (α) μία μεμβράνη υπερδιήθησης (GR40PP, Alfa Laval, Nakskov, Denmark), για τη μεγάλη διάταξη (DSS Labstak

M20, Alfa Laval Nakskov, Denmark), και (β) τρεις μεμβράνες υπερδιήθησης (PLHK, PBHK, Millipore, USA & GR40PP) για τη μικρή διάταξη (αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης 8200, Millipore, USA). Το υλικό κατασκευής των μεμβρανών GR40PP είναι η πολυσουλφόνη, "PS", ενώ για τις μεμβράνες τύπου PLHK και PBHK η αναγεννημένη κυτταρίνη, "RC" και η πολυαιθεροσουλφόνη, "PES", αντίστοιχα. Η μεμβράνη τύπου "PS" εφαρμόστηκε και στις δύο διατάξεις όπως αναφέρθηκε, και γι' αυτό το λόγο διαμορφώθηκε κατάλληλα (κόπηκε προσεκτικά με ψαλίδι), ώστε να εφαρμόσει στις διαστάσεις του κελιού υπερδιήθησης. Αναλυτικότερα, τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή όπως ακριβώς δίδονται από τον κατασκευαστή, καθώς και οι συνθήκες λειτουργίας αυτών κατά τη διάρκεια καθαρισμού των προϊόντων

Κωδικός Τύπο		Υλικό στήριξης&	Τυπικό	Εύρος 	Εύρος	Εύρος	Πιέσεις
	Κωδικός Υλικό στηριζηζα ΜWCO <sup>1</sup> ιεμβράνης ενεργή επιφάνεια (Da)		MWCO <sup>1</sup>		θερμ. <sup>2</sup>	πίεσης <sup>2</sup>	Δοκιμών <sup>3</sup>
μεμρρανης		рн	( °C)	(bar)	(bar)		
GR40PP	$\rm UF^4$	Πολυσουλφόνη	100.000	1-13	0-75	1-10	1, 2, 3
PBHK	$\mathrm{UF}^4$	Πολυαιθεροσουλφόνη	100.000	2-10	0-50	1-5	1, 2, 3
PLHK	UF <sup>4</sup>	Αναγεννημένη Κυτταρίνη	100.000	2-10	0-50	1-5	1, 2, 3

<sup>1</sup> "MWCO" για την τιμή του "μοριακού κατωφλίου".

<sup>2</sup> Προτεινόμενοι παράμετροι λειτουργίας.

<sup>3</sup> Κατά τη διάρκεια πειραμάτων διαχωρισμού, οι δοκιμές σε τιμές πιέσεων που πραγματοποιήθηκαν

<sup>4</sup> "UF" για "υπερδιήθηση"

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε β-γλυκάνη, η προμήθεια της οποίας έγινε από την εταιρεία Megazyme (P-BGOM, Megazyme, Ireland), καθώς και από το εργαστήριο του τομέα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Γεωπονικής σχολής του Α.Π.Θ., όπου απομονώθηκε από το άλευρο βρώμης. Η β-γλυκάνη (~72 g/100 g καθαρότητας επί ξηρού) απομονώθηκε από ένα συμπύκνωμα (καθαρότητας ~19 g/100 g επί ξηρού) που προέκυψε από αλεσμένους σπόρους βρώμης (Avena sativa), οι οποίοι παραλήφθηκαν επίσης από την εταιρεία OATLY AB (Landskrona, Sweden), και η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Skendi et al. (2003). Το μοριακό βάρος των απομονωμένων β-γλυκανών ήταν ίσο με 122 kDa, το οποίο προσδιορίστηκε με ανάλυση HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Lazaridou et al. (2003). Τέλος, όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες αναλύσεις ήταν αναλυτικού βαθμού. Οι χημικές δομικές μονάδες του μελετηθέντος συστατικού (β-γλυκάνης),

αλλά και των υλικών προέλευσης των τριών τύπων μεμβρανών υπερδιήθησης (RC, PES & PS), παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 6.1.).



**Σχήμα 6.1.** Χημικές δομικές μονάδες των υλικών παρασκευής των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν (RC, PES & PS), καθώς και της β-γλυκάνης.

#### 6.2. Μέθοδοι

#### 6.2.1. Αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης

Τα πειράματα μεμβρανών για το πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης πραγματοποιήθηκαν σε ένα αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης κάθετης ροής (Stirred Ultrafiltration Cell 8200, Millipore, USA), η αρχή λειτουργίας του οποίου αναπαρίσταται στο Σχήμα 6.2. Το κελί είναι σχεδιασμένο ώστε να συμπυκνώνει ή να καθαρίζει διαλύματα μακρομορίων, στο οποίο εμπεριέχεται μια μαγνητική ράβδος ανάδευσης προς αποφυγή του φαινόμενου πόλωσης συγκέντρωσης. Η κάτω μεριά του κελιού στηρίζεται και βιδώνει πάνω σε μια πλαστική βάση, πάνω στην οποία τοποθετείται η βάση της μεμβράνης με μια οπή, απ' όπου εξέρχεται το διήθημα μέσω ενός λαστιχένιου σωλήνα. Η επιφάνεια των μεμβρανών είναι ίση με 2,87·10<sup>-3</sup> m<sup>2</sup> (ανά μεμβράνη) και η χωρητικότητα του κελιού ίση με 160 mL. Το κελί κλείνει πιέζοντας ένα καπάκι στην πάνω μεριά του, το οποίο είναι συνδεδεμένο με την παροχή αέρα με έναν πλαστικό σωλήνα. Μια βαλβίδα (πάνω στο καπάκι) ρυθμίζει την είσοδο/έξοδο αέρα μέσα στο κελί και ο έλεγχος της πίεσης (1,2,3 bar) γίνεται με τη βοήθεια ενός μανόμετρου το οποίο είναι συνδεδεμένο στο σύστημα. Η πυκνότητα ροής (L/h·m<sup>2</sup>) μετρούνταν βαρομετρικά, καθώς το βάρος του διηθήματος μεταβαλλόταν συναρτήσει του χρόνου, χρησιμοποιώντας αναλυτικό ζυγό (XT120A, Precisa Instruments Ltd, Switzerland) και ένα ψηφιακό χρονόμετρο (Oregon Scientific, US). Η θερμοκρασία εισόδου και εξόδου διατηρήθηκε σταθερή, ίση με 25±0,5 °C. Κατά τη διάρκεια λειτουργίας του, το κελί εσωκλείεται σε ένα πλαστικό πλαίσιο (διατηρώντας το κλειστό λόγω εφαρμοζόμενης πίεσης) και τοποθετείται πάνω σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα προκειμένου να εξασφαλίζεται η συνεχής ανάδευση του υγρού τροφοδοσίας.



Σχήμα 6.2. Αναπαράσταση της λειτουργίας του αναδευόμενου κελιού υπερδιήθησης

#### 6.2.2. Πιλοτική μονάδα μεμβρανών υπερδιήθησης

Τα πειράματα μεμβρανών τόσο για το πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης όσο και για το επεξεργασμένο απόβλητο πραγματοποιήθηκαν σε μια συσκευή πλακών και πλαισίων (DSS Labstak M20, Alfa Laval Naskov, Denmark),  $\delta\pi\omega\varsigma$  φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 6.3.) Πρόκειται για ένα σύστημα διήθησης μεμβρανών εφαπτομενικής ροής, όπου τα φίλτρα μεμβρανών και οι πλάκες στήριξης αυτών συμπιέζονται σε κάθετη διάταξη με μία υδραυλική χειροκίνητη αντλία (model P392, Enerpac, USA) στα 320 bar. Η συγκεκριμένη μονάδα μπορεί να εφαρμοστεί για διεργασίες μικροδιήθησης, υπερδιήθησης, νανοδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης. Η επιφάνεια των μεμβρανών είναι ίση με  $3.6 \cdot 10^{-2}$  m<sup>2</sup> (δύο φύλλα μεμβρανών των  $1,8\cdot10^{-2}$  m<sup>2</sup> μέσα σε μία πλάκα στήριξης) και υπάρχει δυνατότητα αύξησης της επιφάνειάς τους, εάν τοποθετηθούν "εν σειρά". Ο όγκος του υγρού τροφοδοσίας είναι ίσος με 3 L και ανακυκλώνεται κάθετα στις συμπιεσμένες μεμβράνες με μία βοηθητική αντλία (hydra-cell industrial pump, model G13XDSGHHEMA, Wanner Engineering Inc, USA), εξοπλισμένη με έναν κινητήρα (Varmeca-10, model G13XDSGHHEMA, Leroy Somer, Wanner Engineering Inc, USA). Η ροή ανακύκλωσης ήταν σταθερή, ίση με 38 mL·s<sup>-1</sup>. Η θερμοκρασία εισόδου και εξόδου διατηρούνταν σταθερή, -μέσω ενός εναλλάκτη θερμότητας- ίση με 25±0,5 °C. Επιπρόσθετα, το δοχείο του διαλύματος τροφοδοσίας τοποθετούνταν μέσα σε ένα υδατόλουτρο, όπου η θερμοκρασία του ελέγχονταν με θερμόμετρο (Pt100 class A, Pentronic AB, Sweden). Η δια-μεμβρανική πίεση (transmembrane pressure-"TMP") του υγρού τροφοδοσίας ρυθμιζόταν στο κατάλληλο επίπεδο (1-3 bar) με μία βαλβίδα συγκράτησης και με τη βοήθεια μανόμετρων της συσκευής. Η πυκνότητα ροής  $(L/h \cdot m^2)$  μετρούνταν βαρομετρικά, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που μετρούνταν και στο κελί υπερδιήθησης (παράγραφος 6.2.1).



## 6.3. Προ-επεξεργασία του αποβλήτου και διαχωρισμός των συστατικών του με τη διεργασία των μεμβρανών

#### 6.3.1. Μελέτη εκχύλισης των β-γλυκανών από το απόβλητο

Η εκχύλιση των εναπομενόντων διαλυτών β-γλυκανών στο απόβλητο μελετήθηκε σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο των Wood et al. (1977). Δείγμα αποβλήτου αναμίχθηκε με νερό, σε τρεις διαφορετικές αναλογίες: 1:5, 1:7,5 και 1:10 (διαλύματα τροφοδοσίας: "A", "B" & "C", αντίστοιχα) και αμέσως μετά το pH ρυθμίστηκε από όξινο (pH~5,05) σε βασικό (pH:10), με προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/100 mL). Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 45 °C για μισή ώρα και το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 15000×g για 15 min στους 4 °C, με στόχο την απομάκρυνση των αδιάλυτων στερεών. Το στερεό υπόλειμμα διαγωρίστηκε από το υπερκείμενο υγρό και το pH του κρύου υγρού ρυθμίστηκε σε όξινο (pH:4,5) με την προσθήκη HCl (2 mol/L). Έπειτα, μία δεύτερη φυγοκέντρηση του υγρού σε 21000×g για 20 min στους 4 °C, είχε ως στόχο την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το εκχυλισμένο απόβλητο. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη (διαδοχική) εκχύλιση, στο στερεό υπόλειμμα που διαγωρίστηκε μετά την πρώτη φυγοκέντρηση, ακολουθώντας ακριβώς την ίδια μέθοδο. Τα δύο υπερκείμενα υγρά που λήφθηκαν από τις δύο διαδοχικές εκχυλίσεις, ενώθηκαν, και συμπυκνώθηκαν κατά το ήμισυ με χρήση ενός συμπυκνωτή (60 °C). Το συμπυκνωμένο υγρό συλλέχθηκε και ήταν έτοιμο να χρησιμοποιηθεί ως "διάλυμα τροφοδοσίας" (A, B & C), προερχόμενο από το στερεό απόβλητο βρώμης, για να εφαρμοστεί στο σύστημα των μεμβρανών υπερδιήθησης.

#### 6.3.2. Προ-επεζεργασία των μεμβρανών

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των συστατικών του εκχυλισμένου αποβλήτου ήταν η μεμβράνη τύπου "PS", στη συσκευή πλακών και πλαισίων (DSS Labstak M20), η οποία υπέστη μία προ-επεξεργασία με απιονισμένο νερό ως υγρό τροφοδοσίας (5 L), ώστε να περιοριστεί η συμπίεσή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Στη μεμβράνη ασκήθηκε πίεση των 1, 2 και 3 bar σε δύο συνεχόμενους κύκλους (διάρκειας 10 min για κάθε τιμή πίεσης) χρησιμοποιώντας φρέσκο απιονισμένο νερό. Το διήθημα απομακρυνόταν συνεχώς και φρέσκο απιονισμένο νερό προστίθεντο, προκειμένου να διατηρείται σταθερός ο όγκος του υγρού τροφοδοσίας (5 L). Η πυκνότητα ροής καταμετρήθηκε στα πειράματα προ-επεξεργασίας των μεμβρανών –πριν από κάθε πείραμα διαχωρισμού– σε κάθε τιμή ασκούμενης πίεσης.

#### 6.3.3. Πειράματα διαχωρισμού των συστατικών του αποβλήτου με τη διεργασία των μεμβρανών

Το επεξεργασμένο απόβλητο χρησιμοποιήθηκε ως υγρό τροφοδοσίας στα πειράματα διαχωρισμού των συστατικών του στη συσκευή πλακών και πλαισίων (DSS Labstak, M20), σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ("A", "B" & "C") (παρ. 6.3.1.). Χρησιμοποιήθηκαν προεπεξεργασμένες μεμβράνες υπερδιήθησης (τύπου "PS") (σε τρεις επαναλήψεις για κάθε διαφορετική συγκέντρωση), και κάθε φορά ο όγκος του υγρού τροφοδοσίας ήταν ίσος με 3 L. Κατόπιν της επεξεργασίας του υγρού τροφοδοσίας στις πιέσεις 1, 2 και 3 bar, λήφθηκε όγκος διηθήματος ίσος με 750 mL, και συμπυκνώματος 2250 mL, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε τιμή πίεσης (TMP), τόσο κατά την άνοδο όσο και κατά την κάθοδο (1, 2, 3, 2 και 1 bar), ανακτήθηκε ποσότητα διηθήματος ίση με 150 mL, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις που περιγράφονται σε επόμενη παράγραφο (6.5.). Ταυτόχρονα, προσδιορίστηκε η πυκνότητα ροής για κάθε τιμή πίεσης και υπολογίστηκε η σχετική ροή (relative flux – "RF") των υγρών τροφοδοσίας σε ποσοστό (%) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$RF = \frac{J_{v}}{J_{w0}} \cdot 100 \,(\%)$$

όπου, "J<sub>v</sub>" είναι η πυκνότητα ροής σε σταθερή κατάσταση και "J<sub>w0</sub>" η πυκνότητα ροής του απιονισμένου νερού. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η τιμή της διαπερατότητας, για το νερό "L<sub>w</sub>" ή για το διάλυμα τροφοδοσίας "L<sub>v</sub>", σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$L_w = \frac{J_{w0}}{TMP} \quad \& \quad L_v = \frac{J_v}{TMP}$$

Στο τέλος κάθε πειράματος τα ληφθέντα δείγματα αποθηκεύτηκαν και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις αυτών. Απαραίτητη διαδικασία μετά την ολοκλήρωση κάθε πειράματος διαχωρισμού ήταν η αντικατάσταση του υγρού τροφοδοσίας με απιονισμένο νερό και η επεξεργασία για μία ώρα στις ίδιες τιμές πιέσεων (TPM), όμοια με το πείραμα διαχωρισμού, προκειμένου να καθαριστούν οι μεμβράνες. Ταυτόχρονα προσδιορίστηκε η πυκνότητα ροής με το φρέσκο απιονισμένο νερό στην τροφοδοσία, για κάθε τιμή πίεσης, και υπολογίστηκε η ανάκτηση ροής (flux recovery – "FR") σε ποσοστό (%) σύμφωνα με την εξίσωση που ακολουθεί:

$$FR = \frac{J_{wf}}{J_{w0}} \cdot 100 \,(\%)$$

όπου, " $J_{w0}$ " και " $J_{wf}$ " είναι η πυκνότητα ροής του νερού πριν και μετά το πείραμα διαχωρισμού, αντίστοιχα (Gekas et al., 1993).

## 6.4. Παρασκευή πρότυπου διαλύματος β-γλυκάνης και εφαρμογή της διεργασίας των μεμβρανών

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τροφοδοσίας-μεμβράνης, υγρού χρησιμοποιώντας ως υγρό τροφοδοσίας ένα πρότυπο υδατικό διάλυμα διαλυτοποιημένης βγλυκάνης, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Πρόκειται για ένα "προσομοιωμένο" απόβλητο, το οποίο περιέχει μόνο υδατοδιαλυτή β-γλυκάνη. Η διαλυτοποίησή της πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο της εταιρείας Megazyme (oat betaglucan, P-BGOM, Megazyme). Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή διαλύματος 0,5 % (w/v) διαλυτοποιημένης β-γλυκάνης, 0,5 g β-γλυκάνης διαβρέχτηκαν με 6 mL αιθανόλης (95 %, v/v) και ακολούθησε προσθήκη 90 mL απιονισμένου νερού. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε έντονα αμέσως υπό θέρμανση στους 120 °C για περίπου 10 min. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει (25 °C) και ο όγκος του ρυθμίστηκε στα 100 mL με απιονισμένο νερό. Κατ' αυτόν τον παρασκευάστηκαν διαλύματα διαλυτοποιημένης β-γλυκάνης τρόπο στις παρακάτω συγκεντρώσεις: 200, 600 και 2000 mg/L.

Ακολούθησαν τα πειράματα υγρού τροφοδοσίας-μεμβρανών (σε τρεις επαναλήψεις για κάθε διαφορετική συγκέντρωση) τόσο στη συσκευή πλακών και πλαισίων (DSS Labstak M20) όσο και στο αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης (Stirred Ultrafiltration Cell 8200). Και για τις δύο συσκευές χρησιμοποιήθηκε ως υγρό τροφοδοσίας το πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (200, 600 και 2000 mg/L). Στο αναδευόμενο κελί υπερδιήθησης, το οποίο ουσιαστικά λειτουργεί ως συσκευή διήθησης (χωρίς ανακυκλοφορία του υγρού τροφοδοσίας), χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες ίδιου μοριακού κατωφλιού, αλλά διαφορετικού υλικού κατασκευής. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες υπερδιήθησης τύπου "PS", "RC" και "PES". Οι μεμβράνες προ-επεξεργάστηκαν με απιονισμένο νερό (βλέπε παράγραφο 6.3.2.), και στη συνέχεια το πρότυπο διάλυμα τροφοδοσίας όγκου 160 mL επεξεργάστηκε στις πιέσεις 1, 2 και 3 bar, με λήψη διηθήματος (2 mL) σε κάθε τιμή πίεσης προς προσδιορισμό των ολικών σακχάρων (παράγραφος 6.5.3) και ταυτόχρονη μέτρηση της πυκνότητας ροής. Όμοια με τη διαδικασία που περιγράφεται για το επεξεργασμένο απόβλητο (παράγραφος 6.3.3.) υπολογίστηκε η σχετική ροή "RF", η τιμή της διαπερατότητας για το νερό "L<sub>w</sub>" ή για το διάλυμα τροφοδοσίας "L<sub>v</sub>", καθώς και η ανάκτηση ροής "FR" για το προσομοιωμένο απόβλητο. Αντίστοιχα, διεξήχθησαν πειράματα και στη συσκευή πλακών και πλαισίων με υγρό τροφοδοσίας το πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης, με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας τις μεμβράνες υπερδιήθησης τύπου "PS".

#### 6.5. Αναλύσεις

#### 6.5.1. Προσδιορισμός υγρασίας

Η περιεχόμενη υγρασία στα δείγματα του στερεού αποβλήτου μετρήθηκε (εις τριπλούν) με ξήρανσή τους στους 103 °C μέχρι σταθερού βάρους, από τη διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση.

#### 6.5.2. <u>Προσδιορισμός β-γλυκανών</u>

Ο προσδιορισμός των β-γλυκανών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικό κυτίο της Megazyme (mixed linkage β-glucan assay kit, K-BGLU) με τη μέθοδο των McCleary και Glennie-Holmes (1985). Η αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας αναφέρεται στο Κεφάλαιο 5 (παρ. 5.8.). Οι β-γλυκάνες προσδιορίστηκαν για το επεξεργασμένο (εκχυλισμένο) απόβλητο, και για τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ("A", "B" και "C"). Πιο συγκεκριμένα, αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία εκχύλισης των β-γλυκανών από το στερεό απόβλητο (παράγραφος 6.3.1.), το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε συμπυκνώθηκε (70-80 °C) σε τελικό όγκο 100 mL, και υπέστη μια προεργασία με προσθήκη αιθανόλης και προπανόλης, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που προέκυψε (σε μορφή λεπτής σκόνης) τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα, και διατηρήθηκε εκεί μέχρι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των β-γλυκανών.

#### 6.5.3. <u>Προσδιορισμός ολικών σακχάρων</u>

Τα ολικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά με την προτεινόμενη μέθοδο των Dubois et al. (1956). Πιο συγκεκριμένα, 1 mL αραιωμένου δείγματος αναμίχθηκε έντονα (σε vortex mixer) με 1 mL διαλύματος φαινόλης (5 g/100 mL) μέσα σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, προστέθηκαν 5 mL πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο σωλήνας υπέστη έντονη ανάδευση (σε vortex mixer). Μετά το πέρας 10 min, ο δοκιμαστικός σωλήνας υπέστη ξανά έντονη ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε να κρυώσει για 20 min (υδατόλουτρο 25 °C). Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 490 nm (με φασματοφωτόμετρο UV-mini-1240 Shimadzu) έναντι ενός τυφλού δείγματος που παρασκευάστηκε ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, με απιονισμένο νερό αντί δείγματος. Η πρότυπη καμπύλη ελήφθη με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα γλυκόζης (20-80 mg/L). Ως γνωστόν, η παραπάνω μέθοδος προσδιορίζει ένα ευρύ φάσμα σακχάρων, όπως: απλά σάκχαρα, ολιγο- και πολυσακχαρίτες. Οι περιεχόμενες β-γλυκάνες στα πρότυπα διαλύματα β-γλυκανών προσδιορίστηκαν με αυτή τη μέθοδο (δεδομένου ότι περιείχαν μόνο β-γλυκάνες). Ωστόσο, όσον αφορά το επεξεργασμένο απόβλητο, προσδιορίστηκαν τα ολικά σάκχαρα, και αφαιρέθηκαν και οι περιεχόμενες β-γλυκάνες.

#### 6.5.4. <u>Προσδιορισμός πρωτεϊνών</u>

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl, μέσω προσδιορισμού του περιεχόμενου αμμωνιακού αζώτου. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας SELECTA (μοντέλο Pronitro I). Πιο συγκεκριμένα, 25 mL υγρού δείγματος τοποθετήθηκαν στους ειδικούς σωλήνες χώνευσης (ανθεκτικός, μακρόστενος σωλήνας των 250 mL) και σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 10 mL πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ακολούθησε προσθήκη 2,8 g μίγματος (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>·5H2O) ως καταλύτη της χώνευσης (το μίγμα παρασκευάστηκε με ανάμιξη, 200g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 6 g CuSO<sub>4</sub>·5H2O). Το διάλυμα ανακινήθηκε πολύ προσεκτικά και έπειτα προστέθηκαν 3-4 πορσελάνινες πέτρες βρασμού σε κάθε σωλήνα. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία προετοιμάστηκε και ένα τυφλό δείγμα, στο οποίο αντί υγρού δείγματος τοποθετήθηκε ίση ποσότητα απιονισμένου νερού στον σωλήνα χώνευσης. Η οξείδωση της οργανικής ύλης του δείγματος (χώνευση δείγματος) πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή (συσκευή χώνευσης). Οι σωλήνες χώνευσης τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις της συσκευή χώνευσης, καλυπτόμενοι με ένα ειδικό σκέπασμα που απάγει τα παραγόμενα αέρια. Η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία και η χώνευση έγινε στους 380 °C για 2 ώρες. Μόλις το διάλυμα αποκτήσει ένα διαυγές πρασινωπό χρώμα, η χώνευση έχει ολοκληρωθεί.

Με προσθήκη πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στο δείγμα και θέρμανση, πραγματοποιείται οξείδωση της οργανικής ύλης προς CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και απελευθέρωση του αζώτου σαν NH<sub>3</sub>, η οποία δεσμεύεται από το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σαν (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η αναγωγή του H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> δίνει SO<sub>2</sub>, το οποίο είναι πτητικό.

οργανικές ενώσεις + 
$$H_2SO_4 \Rightarrow CO_2 + H_2O + (NH_4)_2SO_4 + SO_2$$

Στη συνέχεια, μόλις τα δείγματα κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C), ακολουθεί η απόσταξη της NH<sub>3</sub> με υδρατμούς. Σε κάθε σωλήνα απόσταξης προστίθενται προσεκτικά 50 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται κατάλληλα στην αντίστοιχη θέση της συσκευής απόσταξης. Στη θέση του υποδοχέα του αποστάγματος τοποθετείται κατάλληλα κωνική φιάλη των 250 mL με 35 mL διαλύματος βορικού οξέος (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 4% (v/v). Η συσκευή απόσταξης τίθεται σε λειτουργία και προστίθενται προσεκτικά περίπου 60 mL NaOH 33,6 % στον σωλήνα χώνευσης. Με την προσθήκη του διαλύματος NaOH 33,6 % αποδεσμεύεται η NH<sub>3</sub> από το (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:

$$(NH_4)_2 SO_4 + 2NaOH \Rightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$$

Η NH<sub>3</sub> ως πτητική παρασύρεται από τους παραγόμενους υδρατμούς και καταλήγει στον υποδοχέα που περιέχει καθορισμένη ποσότητα πρότυπου διαλύματος H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4 % (v/v). Η ποσότητα του πρότυπου διαλύματος βορικού οξέος 4 % (v/v) είναι περισσότερη από όση απαιτείται για τη δέσμευση της παραγόμενης NH<sub>3</sub>. Η διαδικασία της απόσταξης έχει ολοκληρωθεί όταν στην κωνική φιάλη έχει συμπληρωθεί όγκος ίσος με 120-150 mL.

Τέλος, ακολουθεί τιτλοδότηση δεσμευμένης NH<sub>3</sub> με πρότυπο διάλυμα HCl 0.1 N και δείκτη (μίγματος bromocresol green/methyl red mixed indicator). Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 10 σταγόνες δείκτη στην κωνική φιάλη με το απόσταγμα και ακολουθεί τιτλοδότηση με το πρότυπο διάλυμα HCl 0.1 N, με σκοπό να παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος στο απόσταγμα, από γαλάζιο σε ροζ (βιολετί). Από τον απαιτούμενο όγκο του πρότυπου διαλύματος HCl 0.1 N, υπολογίζεται η περιεκτικότητα του ολικού αζώτου στα δείγματα, αντίστοιχα και των πρωτεϊνών, δεδομένου ότι για τη βρώμη ο συντελεστής μετατροπής του περιεχόμενου αζώτου σε πρωτεΐνη ισούται με 5,83.

#### 6.5.5. Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Οι ολικές φαινόλες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteau (Folin et al., 1927). Πιο συγκεκριμένα, 5 mL δείγματος αναμίχθηκαν για 3 min με 0,25 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau. Κατόπιν της ανάμιξης, ακολουθούσε προσθήκη 1 mL κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (35g/ 100 mL) και το τελικό διάλυμα έμεινε σε σκοτεινό χώρο για μία ώρα. Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 725 nm έναντι ενός τυφλού δείγματος, το οποίο προετοιμάστηκε ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, με απιονισμένο νερό αντί δείγματος. Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην παρασκευή πρότυπου διαλύματος καφεϊκού οξέος σε μεθανόλη/νερό. Πιο αναλυτικά, 1 g καφεϊκού οξέος διαλύθηκε σε 100 mL μεθανόλης και 1 mL του προκύπτοντος διαλύματος αραιώθηκε σε 100 mL απιονισμένου νερού. Από το διάλυμα που προέκυψε (100 mg/L) προετοιμάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα (0-50 mg/L) για την πρότυπη καμπύλη κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις σε νερό. Οι ολικές φαινόλες εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/L).

#### 6.5.6. <u>Προσδιορισμός χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD)</u>

Το COD προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με μέθοδο που βασίζεται στην αναγωγή του διχρωμικού καλίου από οξειδωμένες οργανικές ενώσεις. Δείγμα αποβλήτου αναμίχθηκε με διάλυμα διχρωμικού καλίου (εμπορικό κυτίο της Hanna Instruments) και πραγματοποιήθηκε χώνευση για 120 min στους 150 °C σε ειδική συσκευή χώνευσης (model C9800, Hanna Instruments). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά έναντι ενός τυφλού δείγματος (ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με απιονισμένο νερό αντί δείγματος), με τη χρήση ενός φωτομέτρου (Hanna Instruments Bench Photometer C214).

#### 6.5.7. Προσδιορισμός pH, αγωγιμότητας

Ο προσδιορισμός του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (PH 25, Crison Instruments S.A., Barcelona) και της αγωγιμότητας με ψηφιακό αγωγιμόμετρο (CM 35, Crison Instruments S.A., Barcelona), όπου οι τιμές εκφράστηκαν σε mS/cm.

#### 6.5.8. <u>Προσδιορισμός κατιόντων Κ<sup>+</sup> και Να<sup>+</sup></u>

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης  $K^+$  και  $Na^+$  στα υγρά δείγματα εκχυλισμένου αποβλήτου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC Flame Photometric Method 956.01 (AOAC, 1990a). Πιο αναλυτικά, τα δείγματα (σε τρεις επαναλήψεις) αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό (αραίωση 1:5 για το  $K^+$  και 1:100 για το  $Na^+$ ). Ο προσδιορισμός τους έγινε έναντι πρότυπων διαλυμάτων (0-50 mg  $K^+/L$ , 0-60 mg  $Na^+/L$ ) σε φλογοφωτόμετρο (Carning, 410).

#### 6.5.9. <u>Προσδιορισμός συντελεστών συγκράτησης</u>

Οι συντελεστές συγκράτησης ( $R_{\%}$ ) υπολογίστηκαν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$R_{\%} = \frac{A_{feed} - A_{perm}}{A_{feed}} \cdot 100 \,(\%)$$

όπου, "R<sub>%</sub>" είναι ο συντελεστής συγκράτησης για κάθε παράμετρο, ενώ "A<sub>feed</sub>" και "A<sub>perm</sub>" είναι οι τιμές για κάθε παράμετρο στο διάλυμα τροφοδοσίας και στο διήθημα, αντίστοιχα. Η τιμή αυτή εκφράζεται σε mg/L για τις συγκεντρώσεις "ολικών σακχάρων" (συμπεριλαμβανομένων ή όχι των β-γλυκανών), των β-γλυκανών, των πρωτεϊνών, των ολικών φαινολών, του COD, του καλίου, καθώς επίσης και του νατρίου, ενώ εκφράζεται σε μS/cm για την αγωγιμότητα.

#### 6.6. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν τουλάχιστον σε τρεις επαναλήψεις, και υπολογίστηκε η "μέση τιμή ±τυπική απόκλιση". Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το "students t-test" και συγκρίσεις ανά ζεύγη στο πρόγραμμα Excel (Windows XP 2007). Οι "στατιστικές διαφορές" μεταξύ των δειγμάτων υπολογίστηκαν με αποδεκτό επίπεδο πιθανότητας 5% ( $P \le 0.05$ ) για όλες τις συγκρίσεις.

# ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ Ι

#### 7.1. Κινητικές ενζυμικής υδρόλυσης - Προκαταρκτικά πειράματα

Κατά τα προκαταρκτικά πειράματα, μελετήθηκε η κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης με τη δράση των δύο αμυλασών (α-αμυλάση και β-αμυλάση), εξετάζοντας τα προϊόντα ως προς το περιεχόμενο ποσοστό μαλτόζης. Η ανάλυση έγινε με χρήση ενζυμικού κυτίου γλυκόζης, με έμμεσο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, στα αποτελέσματα συνυπολογίστηκε και το μικρό ποσοστό ελεύθερης γλυκόζης που αρχικά υπήρχε στο άλευρο, το οποίο δεν επηρέασε σημαντικά την έκβαση των τελικών αποτελεσμάτων, διότι απώτερος στόχος ήταν η σύγκριση της συμπεριφοράς των ενζύμων, ξεχωριστά, αλλά και σε συνδυασμό.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η β-αμυλάση παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή μαλτόζης στο τελικό προϊόν, σε σχέση με την α-αμυλάση. Η α-αμυλάση από μόνη της παρήγαγε ένα μίγμα μαλτόζης, γλυκόζης και δεξτρινών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η περίπτωση της ταυτόχρονης δράσης της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης. Παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός αυτών των δύο ενζύμων είχε ως αποτέλεσμα κυρίως μια συνεργιστική, θετική δράση, αλλά σε μερικές περιπτώσεις μια αρνητική παρεμπόδιση προκαλώντας μια προσωρινή μείωση στην παραγόμενη μαλτόζη. Προκειμένου να δοθεί μια περισσότερο ξεκάθαρη εικόνα, στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7.1.) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων κινητικής:



Σχήμα 7.1. Κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης (200 mL, σε συγκέντρωση ίση με 10% w/w) στους 60 °C, με τη δράση των αμυλασών, σε τρεις συνδυασμούς: ( $\diamond$ ): α-αμυλάση (μόνη της) (20 U), ( $\blacksquare$ ): β-αμυλάση (μόνη της) (400 U), και ( $\Box$ ): α-αμυλάση (1 U) και β-αμυλάση (380 U) σε συνδυασμό, αναλογία α-αμυλάσης:β-αμυλάσης ίση με 1:20.

Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν η α-αμυλάση ενεργούσε μόνη της τα ποσοστά παραγόμενης μαλτόζης είναι χαμηλά, δεδομένου ότι η α-αμυλάση δρα με τυχαίο τρόπο. Συνεπώς, ο δισακχαρίτης της μαλτόζης, αλλά και το μόριο της γλυκόζης εμφανίζονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα προϊόντα. Αντιθέτως, το ένζυμο της β-αμυλάσης παράγει συστηματικά προϊόντα μαλτόζης, με αποτέλεσμα να παράγει τέσσερεις φορές πιο υψηλά ποσοστά, σε σχέση με την περίπτωση της α-αμυλάσης. Την καλύτερη απόδοση παρουσίασε η συνδυασμένη δράση των δύο αμυλασών, με ελαφρώς πιο υψηλά ποσοστά μαλτόζης (σε σχέση με την δράση του ενζύμου της β-αμυλάσης), κυρίως μετά την πρώτη ώρα της αντίδρασης. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι μετά από 180 λεπτά από την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης, παρατηρήθηκε μία απότομη μείωση στο ποσοστό της μαλτόζης, αλλά στη συνέχεια το ποσοστό αυξήθηκε σημαντικά, περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη χρονική στιγμή της αντίδρασης. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά θα μπορούσε να δικαιολογηθεί κάνοντας ποικίλες υποθέσεις. Φαινόμενα παρεμπόδισης ενδεχομένως αναστέλλουν τη δράση των αμυλασών, είτε συνθετική δράση των ενζύμων οδηγώντας στο σχηματισμό προϊόντων μεγαλύτερου μεγέθους. Συν τοις άλλοις, ίσως να πρόκειται για πειραματικό σφάλμα, λόγω της περιορισμένης ακρίβειας της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου (ενζυμικό κυτίο γλυκόζης).

Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 7.2.) παρουσιάζεται σύγκριση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν κατά τα προκαταρκτικά πειράματα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα υδρόλυσης χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο της HPLC (τα οποία παρουσιάζονται στην επόμενη παράγραφο). Πιο συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση ως προς τα ποσοστά παραγόμενης μαλτόζης, κατά την υδρόλυση του αλεύρου βρώμης (200 mL, σε συγκέντρωση ίση με 10% w/w, στους 60 °C) με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης.



Σχήμα 7.2. Σύγκριση των αποτελεσμάτων ενζυμικής υδρόλυσης ως προς τα ποσοστά παραγόμενης μαλτόζης, με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης, σε αναλογία α-αμυλάση:β-αμυλάση 1:20. Σύμβολα - (◊): προσδιορισμός μαλτόζης με χρήση αναλυτικού κυτίο γλυκόζης, (■): προσδιορισμός μαλτόζης με τη μέθοδο HPLC.

Παρατηρώντας το παραπάνω σχήμα είναι εμφανής η σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αναλυτικών μεθόδων. Τα ποσοστά μαλτόζης (~20%) κατά τα προκαταρκτικά πειράματα όπως προσδιορίστηκαν με το αναλυτικό κυτίο γλυκόζης, ήταν μικρότερα σε σχέση με τα ποσοστά μαλτοζής που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο HPLC (~35%). Επομένως, διαφαίνονται διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων. Ωστόσο τα αποτελέσματα μας οδήγησαν σε σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά τη δράση των δύο αμυλασών, αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

## 7.2. Μελέτη των κινητικών της ενζυμικής υδρόλυσης του αλεύρου βρώμης (Προσδιορισμός των ολιγοσακχαριτών με τη μέθοδο HPLC)

Η υδρόλυση των υδατικών εναιωρημάτων αλεύρου βρώμης με τις αμυλάσες είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μίας οικογένειας ολιγοσακχαριτών, οι οποίοι προσδιορίστηκαν (ποσοτικά) με

εφαρμογή της μεθόδου της HPLC. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα (HPLC-RI) παρουσιάζεται (Σχήμα 7.3.), όπου διακρίνονται οι οξείες κορυφές των τεσσάρων ολιγοσακχαριτών που ανιχνεύθηκαν στο υδρόλυμα (μετά από μία ώρα υδρόλυσης του υδατικού αιωρήματος βρώμης από το ένζυμο της α-αμυλάσης).



Σχήμα 7.3. Τυπικό (HPLC-RI) χρωματογράφημα ολιγοσακχαριτών, μετά από 1 ώρα υδρόλυσης του υδατικού αιωρήματος βρώμης με το ένζυμο της α-αμυλάσης.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα παρατηρούμε ότι εμφανίζονται και οι τέσσερεις ανιχνεύσιμοι ολιγοσακχαρίτες στα προϊόντα της υδρόλυσης, το οποίο συμβαίνει μόνο στην περίπτωση όπου το ένζυμο της α-αμυλάσης ενεργεί μόνο του (όπως θα παρουσιαστεί και στα αποτελέσματα που ακολουθούν). Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο διότι οι ενδο-αμυλάσες καταλύουν την υδρόλυση του αμύλου με τυχαίο τρόπο στο εσωτερικό του μορίου του, παράγοντας ένα πιο ευρύ φάσμα ολιγοσακχαριτών σε αντίθεση με τις εξω-αμυλάσες που δρουν επιλεκτικά ξεκινώντας από τα άκρα των αλυσίδων (εξωτερικό τμήμα του μορίου του αμύλου) (Gupta et al., 2003).

Όπως πολύ καθαρά φαίνεται στο Σχήμα 7.4γ., τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης από τη δράση της α-αμυλάσης (μόνη της), είναι η μαλτόζη (35%) και η μαλτοτριόζη (25%), ενώ η γλυκόζη και η μαλτοτετραόζη εμφανίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις, μετά την πρώτη ώρα της ενζυμικής υδρόλυσης. Στη συνέχεια της αντίδρασης, παρατηρείται μια ευθυγράμμιση της καμπύλης μέχρι και το τέλος της αντίδρασης της υδρόλυσης (3 ώρες). Η γλυκόζη εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα -σχεδόν μη-ανιχνεύσιμα-, ενώ η μαλτοτετραόζη ανιχνεύεται μετά τα πρώτα 15 λεπτά της αντίδρασης της υδρόλυσης σε ποσοστό 10% στο σύνολο των παραγόμενων προϊόντων, αλλά στη συνέχεια μειώνεται αισθητά.



Σχήμα 7.4. Κινητική της ενζυμικής υδρόλυσης για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης (200 mL, σε συγκέντρωση ίση με 10% w/w) στους 60 °C, με τη δράση των ενζύμων: (α) α-αμυλάσης (4,16 FAU) και β-αμυλάσης (57°L), (β) β-αμυλάσης (μόνη της) (60°L), και (γ) α-αμυλάσης (μόνη της) (83,3 FAU), [Σύμβολα – ( $\clubsuit$ ):γλυκόζη, ( $\diamond$ ):μαλτοτριόζη, ( $\square$ ):μαλτοτετραόζη].

Ωστόσο, η παραγωγή της μαλτόζης παρατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό όταν και οι δύο αμυλάσες συμμετέχουν στην ενζυμική αντίδραση (Σχήμα 7.4α.), και σε ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά όταν η β-αμυλάση ενεργεί από μόνη της (Σχήμα 7.4β.). Συγκρίνοντας τα επίπεδα της παραγόμενης μαλτόζης στις δύο τελευταίες περιπτώσεις (Σχήμα 7.4α&7.4β), βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των τιμών (Fisher's LSD τεστ, εξετάζοντας τα διαστήματα εμπιστοσύνης, Minitab 14). Ποσοτικά, η μαλτόζη είναι το σημαντικότερο προϊόν, καθώς εμφανίζεται σε ποσοστό ίσο με 60% στο σύνολο των προϊόντων. Εξήγηση αποτελεί το γεγονός ότι το ένζυμο της β-αμυλάσης απελευθερώνει επιτυχώς μονάδες β-μαλτόζης από τα μη-αναγωγικά άκρα των αλυσίδων του αμύλου (Nascimento et al., 2006). Επιπρόσθετα, η α-αμυλάση ενισχύει την παραγωγή μαλτόζης λόγω της τυχαίας δράσης της σε μεγάλες γραμμικές αλυσίδες γλυκόζης στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης της υδρόλυσης. Σε δεύτερη φάση, το ένζυμο της β-αμυλάση των δύο αμυλασών που παρατηρείται σε αυτή την περίπτωση δημιουργεί ενδείξεις ενδεχόμενων φαινόμενων συνέργειας μεταξύ των δύο ενζύμων.

Παρόμοια αποτελέσματα στην παραγωγή ολιγοσακχαριτών (γλυκόζης, μαλτόζης, μαλτοτριόζης και μαλτοτετραόζης) παρουσιάστηκαν από τους Morales et al. (2008) κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν άμυλο από κασάβα (τροπικός βολβός), και υδρολύθηκε από το ένζυμο της α-αμυλάσης. Ομοίως με τα αποτελέσματά μας, παρατήρησαν μια ευθυγράμμιση της καμπύλης κατά την παραγωγή μαλτόζης και μαλτοτριόζης, αλλά μετά τις 2,5 πρώτες ώρες της ενζυμικής υδρόλυσης. Οι Paolucci-Jeanjean et al. (2000) παρατήρησαν αντίστοιχα προφίλ κινητικής, ως προς την παραγόμενη μαλτόζη και μαλτοτριόζη, όπου σημειώθηκε μια αυξητική πορεία στα ποσοστά των δύο παραγόμενων σακχάρων κατά τις πρώτες 1,5-2 ώρες της ενζυμικής αντίδρασης, την οποία διαδέχτηκε μια ευθυγράμμιση της καμπύλης μέχρι το τέλος της αντίδρασης (6 ώρες). Σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα ήταν πάλι η κασάβα, και το ένζυμο ήταν ένα εμπορικό σκεύασμα α-αμυλάσης (Termamyl), το οποίο ωστόσο παρουσίαζε δράση εξω-ενζύμου. Οι Doyle et al. (1998) έδειξαν στα αποτελέσματά τους ότι το τελικό ποσοστό παραγόμενης μαλτόζης (55%, w/w) που παράχθηκε από τη δράση της B. fulva α-αμυλάσης (με υπόστρωμα ένα διάλυμα αμύλου, 1% w/v), έφτασε σε μία ευθυγράμμιση της καμπύλης μετά από 10-12 ώρες ενζυμικής αντίδρασης. Όσον αφορά τα ποσοστά της παραγόμενης μαλτοτριόζης, παρατηρήθηκε μία απότομη αύξηση στις 5 πρώτες ώρες της αντίδρασης (37% w/w), έπειτα μία μείωση της συγκέντρωσης κατά το ήμισυ, με ταυτόχρονη παραγωγή γλυκόζης στα ίδια επίπεδα. Αυτό σημαίνει ότι η μαλτοτριόζη διασπάστηκε περαιτέρω παράγοντας γλυκόζη. Οι Besselink et al. (2008) κατέληξαν σε χαμηλότερα επίπεδα παραγόμενης μαλτόζης (15% w/w), η παραγωγή της οποίας ξεκίνησε μετά την πρώτη ώρα της ενζυμικής αντίδρασης, με τη μέγιστη τιμή της μετά από 5 ώρες αντίδρασης. Σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα ήταν το άμυλο σιταριού, υπό τη δράση του ενζύμου της B.

*licheniformis* α-αμυλάσης, παράγοντας υψηλότερα επίπεδα μαλτοτριόζης (20% w/w) αντί μαλτόζης, μετά από 5 ώρες υδρόλυσης.

Παρατηρώντας τη συμπεριφορά των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης των υδατικών εναιωρημάτων αλεύρου βρώμης από τις αμυλάσες, διακρίνουμε δύο διαφορετικές ζώνες: μία ταχύτατη παραγωγή σακγάρων που οφείλεται στην υδρόλυση των εύκολα προσβάσιμων μοριακών αλυσίδων του αμύλου (τα πρώτα 30 λεπτά της αντίδρασης), και μία δεύτερη ζώνη, όπου η παραγωγή σακχάρων συμβαίνει με πολύ αργούς ρυθμούς, ή έχει σταματήσει. Όμοια, οι Brandam et al. (2002) διέκριναν δύο στάδια κατά την ενζυμική υδρόλυση αμύλου, υπό διαφορετικές συνθήκες πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο, το ζελατινοποιημένο άμυλο μετατρέπεται ταχύτατα σε ολιγοσακχαρίτες μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (90%, σε 10 λεπτά) λόγω της συνδυασμένης ή ξεχωριστής δράσης της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης. Απεναντίας, κατά το δεύτερο στάδιο, το υπόστρωμα δεν είναι εύκολα προσβάσιμο από τις αμυλάσες, εξαιτίας της παρουσίας έντονα διακλαδισμένων αλυσίδων γλυκόζης. Πιο αναλυτικά, οι δύο αμυλάσες δύσκολα καταλύουν τους  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) δεσμούς που βρίσκονται μεταξύ των διακλαδισμένων αλυσίδων της γλυκόζης, δεδομένου ότι δεν δύνανται να υδρολύσουν και τους α- $(1 \rightarrow 6)$  δεσμούς της αμυλοπηκτίνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η ταχύτητα παραγωγής ολιγοσακχαριτών. Ωστόσο, η καταλυτική διαδικασία εξακολουθεί να συνεχίζεται μέχρι πλήρους υδρόλυσης, αλλά με επιβραδυνόμενους ρυθμούς απαιτώντας πολύ χρόνο.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο δοκιμαστικών πειραμάτων της ενζυμικής υδρόλυσης σε δύο στάδια (Σχήμα 7.5.), και της διαδοχικής ενζυμικής υδρόλυσης (Σχήμα 7.6.).



**Σχήμα 7.5.** Υδρόλυση αλεύρου βρώμης σε δύο στάδια, από την α-αμυλάση (4,16 FAU) και τη β-αμυλάση (57°L), σε 200 mL υδατικού αιωρήματος βρώμης, συγκέντρωσης 10% (w/w).



**Σχήμα 7.6.** Διαδοχική ενζυμική υδρόλυση αλεύρου βρώμης από την α-αμυλάση (4,16 FAU) και τη β-αμυλάση (57°L), σε 200 mL υδατικού αιωρήματος βρώμης, συγκέντρωσης 10 (w/w).

Και στις δύο περιπτώσεις δεν σημειώθηκε διαφοροποίηση ως προς τα επίπεδα των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών. Τροποποιήθηκαν ελαφρώς οι συνθήκες της ενζυμικής υδρόλυσης, προκειμένου να προσεγγίσουμε περισσότερο τη γραμμή παραγωγής που ακολουθείται στη βιομηχανία, αυξάνοντας ενδεχομένως την απόδοση του συστήματος. Ωστόσο, συγκρίνοντας τα ποσοστά των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών με εκείνα των πειραμάτων που περιγράφηκαν πιο πάνω (Σχήμα 7.4α.), δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές στα αποτελέσματα. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7.7.) πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των κινητικών των υδατικών εναιωρημάτων βρώμης προερχόμενων από τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα του αλεύρου βρώμης, ως προς τα επίπεδα παραγόμενης μαλτόζης και μαλτοτριόζης. Παρατηρώντας τα δύο γραφήματα, δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των τριών κλασμάτων. Συγκεκριμένα, τα προφίλ των κινητικών για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά με το συνολικό άλευρο βρώμης.



Σχήμα 7.7. Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων παραγόμενης (α) μαλτόζης, και (β) μαλτοτριόζης, κατά τη διάρκεια υδρόλυσης (60 °C) του συνολικού άλευρου βρώμης και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων, με το ένζυμο της ααμυλάσης (4,16 FAU) και της β-αμυλάσης (57°L), σε 200 mL υδατικού αιωρήματος βρώμης συγκέντρωσης 10% (w/w).

Αντιθέτως, σε μελέτη των Mahasukhonthachat et al. (2010), το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος επηρέασε την κινητική της υδρόλυσης. Στα πειράματά τους χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από σόργο αλεσμένοι σε σφυρόμυλο σε 10 διαφορετικά κοκκομετρικά κλάσματα (~120-560μm) και διαπιστώθηκε ότι όσο πιο μικρό ήταν το μέγεθος των κόκκων τόσο πιο αποδομήσιμο ήταν το σόργο, πιθανότατα λόγω της αυξημένης ειδικής επιφάνειας. Επιπρόσθετα, οι Al-Rabadi et al., (2009) μελέτησαν τις κινητικές της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου, χρησιμοποιώντας αλεσμένους σπόρους κριθαριού και σόργου, όπου τα μεγέθη των σωματιδίων

διέφεραν, από 0,1 έως 3 mm. Τα αποτελέσματά τους ενίσχυσαν την άποψη ότι το μέγεθος των κλασμάτων, καθώς επίσης και η κατανομή τους αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα κατά την υδρόλυση του αμύλου.

#### 7.3. Προσδιορισμοί χημικής σύστασης & χρώματος του υδατικού αιωρήματος βρώμης

Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών ολικού αμύλου, της περιεκτικότητας σε β-γλυκάνες, για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης (και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα αλεύρου), καθώς επίσης και ο βαθμός υδρόλυσης, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.1.).

**Πίνακας 7.1.** Προσδιορισμός β-λυκανών και ολικού αμύλου για τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης (και τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα), και βαθμού υδρόλυσης από την συνδυασμένη δράση της ααμυλάσης και της β-αμυλάσης (3 ώρες, 60 °C).

	Περιεκτικότητα σε ολικό άμυλο (g/100g αλεύρου)	Περιεκτικότητα σε ολικές β-γλυκάνες (g/100g αλεύρου)	Βαθμός υδρόλυσης του αμύλου (% w/w)
συνολικό άλευρο βρώμης	61,46±0,35	4,36±0,24	69,28±3,22
κλάσμα>500μm	53,44±1,68	6,29±0,41	67,92±2,28
500μm>κλάσμα>250μm	65,46±1,74	2,65±0,36	70,52±0,85
κλάσμα<250μm	75,40±0,64	1,14±0,13	67,74±1,25

Το υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης παρατηρήθηκε για το μεσαίο κοκκομετρικό κλάσμα (70,5%), το οποίο είναι πολύ κοντά με το συνολικό άλευρο βρώμης (69,3%). Επίσης, τα ποσοστά υδρόλυσης για το χονδρόκοκκο και το λεπτόκοκκο κλάσμα δεν διαφέρουν πολύ από τις προηγούμενες τιμές. Η υδρόλυση και για τα δύο κλάσματα (λεπτόκοκκο και χονδρόκοκκο κλάσμα) συμβαίνει σε ποσοστό περίπου ίσο με 68%. Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι το λεπτόκοκκο κλάσμα αλεύρου περιέχει το υψηλότερο αρχικό ποσοστό αμύλου (75,4%), θα ήταν αναμενόμενο να αποδομείται πιο έντονα από τις αμυλάσες σε σύγκριση με τις άλλες τρεις περιπτώσεις. Από την άλλη μεριά, το ποσοστό υδρόλυσης για το χονδρόκοκκο κλάσμα σχετίζεται άμεσα με την αρχική του περιεκτικότητα σε άμυλο. Πρόκειται για το κοκκομετρικό κλάσμα αλεύρου με το υψηλότερο ποσοστό β-γλυκανών και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε άμυλο, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζει υψηλές τάσεις υδρόλυσης.

Στον Πίνακα 7.2. δίνονται οι τιμές των παραμέτρων χρώματος ( $L^*$ ,  $a^*$ , και  $b^*$ ) για τα υπερκείμενα στρώματα των υδρολυμάτων του υδατικού αιωρήματος βρώμης. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς το χρώμα μεταξύ των δειγμάτων, μόνον για το λεπτόκοκκο κλάσμα, το οποίο παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές για τις παραμέτρους  $L^*$  και  $b^*$ .

	<i>L</i> *	<i>a*</i>	<i>b</i> *
Συνολικό άλευρο βρώμης	68,91±1,77	-2,49±0,09	6,15±0,38
κλάσμα>500μm	68,33±2,28	$-2,15\pm0,1$	7,58±0,31
500μm>κλάσμα>250μm	63,21±2,02	-2,38±0,09	5,89±0,19
κλάσμα<250μm	58,38±2,27	-2,54±0,1	2,47±0,28

**Πίνακας 7.2.** Ανάλυση χρώματος για τα υπερκείμενα στρώματα (10min σε 615  $\times$  g) των υδρολυμάτων. Τα υδατικά εναιωρήματα αλεύρου βρώμης (και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων) υδρολύθηκαν (1 ώρα, 60 °C) με τη συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης.

#### 7.4. Επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης και της κλασματοποίησης στο ιζώδες

Οι αμυλάσες -κυρίως οι ενδο-αμυλάσες- μετέβαλλαν τη ρεολογική συμπεριφορά των υδατικών εναιωρημάτων αμύλου, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προκαλέσουν μία απότομη ελάττωση στο ιξώδες. Παρατηρώντας το Σχήμα 7.8. βλέπουμε μία εκτεταμένη ελάττωση του ιξώδους που οφείλεται στη γαρακτηριστική (τυγαία) δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης. Αντιθέτως, οι εξωαμυλάσες έχουν μικρή επίδραση στις ρεολογικές ιδιότητες των υδατικών αιωρημάτων αμύλου, προκαλώντας μία πιο αργή μεταβολή του ιξώδους (Muralikrishna & Nirmala, 2005). Μία επιπλέον εξήγηση για τη συμπεριφορά της β-αμυλάσης θα μπορούσε να δοθεί από το γεγονός ότι, σε ένα υδατικό σύστημα διασποράς αμύλου, η δράση του ενζύμου της β-αμυλάσης θα μπορούσε πολύ γρήγορα να μπλοκαριστεί από τους α- $(1 \rightarrow 6)$  δεσμούς σε αντίθεση με το ένζυμο της α-αμυλάσης (Williamson et al., 1992). Επομένως, η α-αμυλάση υδρολύει τα υδατικά συστήματα διασποράς αμύλου πολύ πιο γρήγορα απ' ότι η β-αμυλάση, καθώς δύναται να προσπεράσει -χωρίς να υδρολύσει- τους α- $(1 \rightarrow 6)$  δεσμούς, και να συνεχίσει τα δράση της υδρολύοντας τους α- $(1 \rightarrow 4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς (Ma et al., 2006). Επιπρόσθετα, προσβάλλοντας τις αλυσίδες των πολυσακχαριτών με έναν τυχαίο, ενδογενή τρόπο, το ένζυμο της α-αμυλάσης προκαλεί μία σημαντική ελάττωση στο μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών του αμύλου (Tester et al., 2006), το οποίο φαίνεται και στο Σχήμα 7.8. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παρόμοιες περιπτώσεις αποκαλύπτοντας τόσο την έντονη όσο και την περιορισμένη δράση της α-αμυλάσης και της β-αμυλάσης, αντίστοιχα, που επηρεάζουν τις ρεολογικές ιδιότητες του αμύλου (Leman et al., 2005, Leman et al., 2006). Ωστόσο, η συνδυασμένη δράση των δύο αμυλασών δεν έδειξε διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με την περίπτωση όπου η β-αμυλάση ενεργούσε μόνη της.



Σχήμα 7.8. Σύγκριση του ιξώδους κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης (60 °C, 200 s<sup>-1</sup>), με το ένζυμο της α-αμυλάσης (8,3 FAU), της β-αμυλάσης (6°L) & της συνδυασμένης δράσης της α-αμυλάσης (0,416 FAU) και της β-αμυλάσης (5,7°L), σε 20 ml υδατικού εναιωρήματος αλεύρου βρώμης, συγκέντρωσης 10% (w/w).

Οι παραπάνω διαπιστώσεις έγιναν περισσότερο σαφείς και ξεκάθαρες, όταν μελετήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων των αλεύρων ξεχωριστά. Από το Σχήμα 7.9. είναι εμφανές ότι το υψηλότερο επίπεδο μείωσης του ιξώδους παρατηρήθηκε για το πιο λεπτόκοκκο κλάσμα (<250 μm), αποτέλεσμα το οποίο ήταν αναμενόμενο, καθότι το συγκεκριμένο κλάσμα είναι το περισσότερο πλούσιο σε άμυλο, με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (Πίνακας 7.1.). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται μία σύγκριση της συμπεριφοράς του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα του αλεύρου, καθώς επίσης και για την αρχική πρώτη ύλη, το συνολικό άλευρο βρώμης.



Σχήμα 7.9. Σύγκριση του ιξώδους κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης (60°C, 200 s<sup>-1</sup>), του συνολικού αλεύρου και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων, με τη συνδυασμένη δράση των ενζύμων της α-αμυλάσης (0,416 FAU) και της β-αμυλάσης (5,7°L), σε 20 ml υδατικού εναιωρήματος αλεύρου βρώμης, συγκέντρωσης 10% (w/w).

Τα δεδομένα του παραπάνω σχήματος (Σχήμα 7.9.) απεικονίζουν τις ουσιώδεις διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των διαφορετικών κοκκομετρικών κλασμάτων αλεύρου που μελετήθηκαν. Παρατηρήθηκε μία άμεση συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε άμυλο και β-γλυκάνες, πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση (Πίνακας 7.1.). Το χονδρόκκοκο κλάσμα (μέγεθος μορίων>500 μm) εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα ιξώδους, ενώ το λεπτόκοκκο κλάσμα (μέγεθος μορίων>500 μm) παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές ιξώδους καθόλη τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης. Το μέγεθος των σωματιδίων παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτή την περίπτωση, δεδομένου ότι το μέγεθος ελέγχει την προσβασιμότητα των ενζύμων στο εσωτερικό του σωματιδίου, ρυθμίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την υδρόλυσης) (Tester et al., 2006). Έχει αναφερθεί ότι η υδρόλυση του μορίου του αμύλου αποτελεί συνάρτηση τόσο του εμβαδού της επιφάνειας (Kong et al., 2003) όσο και του μεγέθους των κόκκων. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνοντας το μέγεθος των αμυλοκόκκων μειώνεται η ειδική επιφάνεια, με αποτέλεσμα να μειώνεται και το υπόστρωμα προς υδρόλυση από τις αμυλάσες (Tester et al., 2006).

## 7.5. Έλεγχος ύπαρζης υπολειμματικής β-γλυκανάσης στα βιομηχανικά ενζυμικά σκευάσματα (α-αμυλάση και β-αμυλάση)

Προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη ή όχι υπολειμματικής β-γλυκανάσης στα βιομηχανικά ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική υδρόλυση, πραγματοποιήθηκε κάποιος πειραματικός έλεγχος. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα καθαρής διαλυτοποιημένης β-γλυκάνης χαμηλής συγκέντρωσης (1%, w/w), και διερευνήθηκε η μεταβολή του ιξώδους μετά την προσθήκη των δύο αμυλασών (α-αμυλάση και β-αμυλάση), αλλά και χωρίς την προσθήκη των ενζύμων (τυφλό δείγμα). Παρατηρώντας την εξέλιξη του ιξώδους στο διάλυμα μετά την προσθήκη των ενζύμων, σε σύγκριση με το διάλυμα που δεν περιείχε τα ένζυμα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα δεν περιείχαν καθόλου β-γλυκανάση, απ' τη στιγμή που το ιξώδες δεν μεταβαλλόταν (Σχήμα 7.10.).



Σχήμα 7.10. Το ιξώδες κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης (60°C, 200 s<sup>-1</sup>) σε 20 ml ενός διαλύματος καθαρής β-γλυκάνης συγκέντρωσης 1% (w/w), με τη δράση των ενζύμων της α-αμυλάσης (0,416 FAU) και της βαμυλάσης (5,7°L) – Έλεγχος της πιθανής παρουσίας της υπολειμματικής ενεργότητας της β-γλυκανάσης στα βιομηχανικά σκευάσματα των δύο αμυλασών (α-αμυλάση και β-αμυλάση).

Παρατηρούμε ότι τα δύο προφίλ του ιξώδους συμπίπτουν, επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος διάσπασης των β-γλυκανών κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης.

#### 7.6. Ρεολογική συμπεριφορά των υδρολυμάτων αλεύρου βρώμης

Η ρεολογική συμπεριφορά των υδρολυμάτων του συνολικού αλεύρου βρώμης και των τριών κοκκομετρικών κλασμάτων (25 °C) παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7.11.). Σε μικρές τιμές ρυθμού της διάτμησης η συμπεριφορά είναι Νευτώνεια. Το λεπτόκοκκο κλάσμα (κλάσμα<250 μm) παρουσιάζει σχεδόν Νευτώνεια συμπεριφορά, από τη στιγμή που το φαινομενικό ιξώδες είναι ανεξάρτητο από τον ρυθμό διάτμησης. Αντιθέτως, το συνολικό άλευρο βρώμης και τα άλλα δύο κοκκομετρικά κλάσματα παρουσιάζουν την τυπική ψευδοπλαστική συμπεριφορά, με συνεχή μείωση του φαινομενικού ιξώδους για ένα μεγάλο εύρος ρυθμού διάτμησης (0,1-1000 s<sup>-1</sup>). Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει αποδείξει ότι τα συστήματα διασποράς αμύλου (ποικίλης βοτανικής προέλευσης), παρουσιάζουν κυρίως ψευδοπλαστική συμπεριφορά ροής και καθοριστικής σημασίας είναι το μέγεθος των αμυλοκόκκων (Rao et al., 1997). Το χονδρόκοκκο κλάσμα (κλάσμα>250 μm) παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές του φαινομενικού ιξώδους για ένα χαμηλό εύρος ρυθμού διάτμησης, αλλά καθώς αυξάνεται η τάση διάτμησης παρατηρείται μία απότομη μείωση του ιξώδους, σε σύγκριση με τα άλλα κοκκομετρικά κλάσματα αλεύρου βρώμης. Όσον αφορά το συνολικό άλευρο βρώμης και το ενδιάμεσο κοκκομετρικό κλάσμα (500μm<κλάσμα<250μm), παρουσιάζουν όμοια ρεολογική συμπεριφορά, επιδεικνύοντας μία πολύ μικρή μείωση του φαινομενικού ιξώδους για υψηλές τιμές τάσης διάτμησης.



Σχήμα 7.11. Φαινομενικό ιξώδες σε ένα εύρος ρυθμού διάτμησης (25°C) των ενζυμικών υδρολυμάτων: α-αμυλάση (4,16 FAU) και β-αμυλάση (57°L) σε 200 ml, υδατικού αιωρήματος βρώμης, σε συγκέντρωση 10% (w/w), για το συνολικό άλευρο βρώμης και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα (1 ώρα υδρόλυσης, 60°C). Σύμβολα: (×): κλάσμα>500μm, ( $\Box$ ): 500μm>κλάσμα>250μm, ( $\blacktriangle$ ): συνολικό άλευρο βρώμης, (Ο): κλάσμα<250μm.

Σε γενικές γραμμές, ανεξαρτήτως του μεγέθους των κόκκων του αλεύρου, τα δείγματα παρουσίασαν μια ρεολογική συμπεριφορά η οποία είναι χαρακτηριστική για τα ψευδοπλαστικά ρευστά.

#### 7.7. Επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινομενικό ιξώδες και μηχανικά φάσματα

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινομενικό ιξώδες για το χονδρόκοκκο κλάσμα αλεύρου (κλάσμα>500μm) και για το συνολικό άλευρο βρώμης, παρουσιάζεται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 7.12α-β). Αρχικά, παρατηρείται ότι το ιξώδες είναι υψηλότερο για το χονδρόκοκκο κλάσμα, σε όλο το εύρος του ρυθμού διάτμησης. Επίσης, υπάρχει μία ελαφρώς περισσότερο έντονη εξάρτηση του ιξώδους από τον ρυθμό διάτμησης κυρίως για το χονδρόκοκκο κλάσμα αλεύρου, σε σχέση με το συνολικό άλευρο βρώμης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε λιγότερο απότομη μείωση του ιξώδους, το οποίο είναι απολύτως αναμενόμενο. Γενικότερα, και για τις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 7.12α-β.) παρατηρούμε ότι το ιξώδες μειώνεται αυξανομένης της θερμοκρασίας, το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε μία αύξηση των διαμοριακών αποστάσεων, σαν αποτέλεσμα θερμικής διαστολής (Yoo, 2006). Η εξάρτηση του ιξώδους από την εξίσωση Arrhenius (Σχήμα 7.12α-β., εσωτερικά σχήματα), και έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές, για συστήματα διασποράς αμύλου (Kim & Yoo, 2009). Η εξίσωση Arrhenius αποτελεί την ποσοτική βάση της σχέσης μεταξύ της θερμοκρασίας και του ρυθμού με τον οποίο εξελίσσεται μία αντίδραση. Και στις δύο

θερμοκρασίας.

περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η καμπύλη και για τα δύο διαγράμματα Arrhenius τοποθετείται κάτω από τον άξονα x, λαμβάνοντας αρνητικές τιμές. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα διαγράμματα κατασκευάστηκαν για έναν σταθερό ρυθμό διάτμησης, ίσο με 92,4 s<sup>-1</sup>. Οι ενέργειες ενεργοποίησης ( $E_a$ ) υπολογίστηκαν μέσω της καμπύλης που αναπαριστά τη σχέση μεταξύ του log( $\eta$ ) και του (1/T), για το χονδρόκοκκο κλάσμα και για το συνολικό άλευρο βρώμης, και είναι ίσες με 7,48 kJmol<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0,9975) και 5,16 kJmol<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0,8983), αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης Arrhenius είναι μία παράμετρος η οποία προσδιορίζεται πειραματικά, επιδεικνύοντας την ευαισθησία του ρυθμού της αντίδρασης ως προς τον παράγοντα της



**Σχήμα 7.12.** Επίδραση της θερμοκρασίας στο ιξώδες των ενζυμικών υδρολυμάτων: α-αμυλάση (4,16 FAU) και β-αμυλάση (57°L) σε 200 ml υδατικού αιωρήματος βρώμης, σε συγκέντρωση ίση με 10% (w/w), για: (a) το συνολικό άλευρο βρώμης, και (β) το κοκκομετρικό κλάσμα αλεύρου βρώμης με μέγεθος μορίων>500μm (1 ώρα υδρόλυσης, 60°C), και το διάγραμμα Arthenius για το ιξώδες έναντι της θερμοκρασίας (εσωτερικό σχήμα). Οι συγκεκριμένες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για τα υπερκείμενα στρώματα των υδρολυμάτων (10 min σε 615 × g).

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα μηχανικά φάσματα για τα ενζυμικά υδρολύματα για συνολικό άλευρο βρώμης, καθώς επίσης και για τα τρία κοκκομετρικά κλάσματα (Σχήμα 7.13.). Γενικότερα, τα μηχανικά φάσματα προσδίδουν πληροφορίες με σκοπό να χαρακτηρίζουν, αλλά και να εντάξουν τα συστήματα διασποράς σε κάποια κατηγορία, ανάλογα με τη συμπεριφορά που επιδεικνύουν. Τα υδρολύματα παρουσίασαν την κλασική ιξωδοελαστική συμπεριφορά που παρουσιάζουν όλα τα υδατικά συστήματα διασποράς μακρομορίων, όπου το G'' (ιξώδης συνιστώσα) ήταν μεγαλύτερο από το G' (συνιστώσα ελαστικότητας). Γενικότερα, οι τιμές των συνιστωσών G' και G'' παρουσίασαν μία σημαντική εξάρτηση από τη συχνότητα, και πιο συγκεκριμένα, αυξάνονταν αναλογικά με τη συχνότητα, το οποίο παρατηρήθηκε για όλα τα υδρολύματα.



Σχήμα 7.13. Μηχανικά φάσματα ( $\gamma = 0,1\%$ , 25°C) των ενζυμικών υδρολυμάτων, για: (α) το συνολικό άλευρο βρώμης, (β) το κοκκομετρικό κλάσμα άλευρου βρώμης με μέγεθος μορίων>500μm, (γ) το κοκκομετρικό κλάσμα άλευρου με 500μm>μέγεθος μορίων>250μm, και (δ) το κοκκομετρικό κλάσμα άλευρου με μέγεθος μορίων<250μm: α-αμυλάση (4,16 FAU) και β-αμυλάση (57°L) σε 200 ml υδατικού συστήματος διασποράς αλεύρου, σε συγκέντρωση 10% (w/w) (μία ώρα υδρόλυσης, 60°C). (Σύμβολα: ( $\Box$ ):G', ( $\blacklozenge$ ):G'', ( $\blacktriangle$ ):Σύνθετο ιξώδες).

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Closs et al. (1999), οι οποίοι μελέτησαν τη ρεολογική συμπεριφορά μιγμάτων πολυσακχαριτών. Στα αποτελέσματά μας, το G΄ συμπίπτει με το G΄΄ (crossover), για υψηλές τιμές συχνότητας, και πιο συγκεκριμένα, στα 8 και 5 Hz (κάτω των 10 Hz) για το συνολικό άλευρο βρώμης (Σχήμα 7.13α), και για το χονδρόκοκκο κλάσμα αλεύρου (Σχήμα 7.13β.), αντίστοιγα. Όσον αφορά το ενδιάμεσο κοκκομετρικό κλάσμα (Σχήμα 7.13γ.) οι δύο συνιστώσες (G' και G'') συμπίπτουν στα 12 Hz, ενώ το λεπτόκοκκο κλάσμα παρουσίασε μία ελαφρώς διαφορετική συμπεριφορά (Σχήμα 7.13δ.). Σε γενικές γραμμές, για χαμηλές τιμές συχνότητας (αλλά για ένα μικρό εύρος συχνοτήτων), το G' είναι υψηλότερο από το G'', αλλά αμέσως μετά παρατηρείται μια επικάλυψη μεταξύ των δύο συνιστωσών, σε συχνότητες μεταξύ 0,5 και 7 Hz. Έπειτα, σε συχνότητες άνω των 7 Hz, το G'' είναι μεγαλύτερο από το G', το οποίο σημαίνει ότι δεν παρατηρούνται ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (Yoo, 2006). Όταν G'>G'' το υδρόλυμα συμπεριφέρεται ως ελαστικό σώμα (στερεό), ενώ στην περίπτωση όπου το G' θα είχε μεγαλύτερη τιμή, θα συμπεριφερόταν ως ιξώδες σώμα (υγρό). Σε καμία από τις παραπάνω τέσσερεις περιπτώσεις δεν παρατηρείται ευθυγράμμιση της καμπύλης, αλλά υπάρχει μία έντονη εξάρτηση των δύο συνιστωσών (G' και G'') από τη συχνότητα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι υψηλότερες τιμές για την ιξώδη συνιστώσα (G') παρατηρήθηκαν στην αρχή της μέτρησης για το χονδρόκοκκο κλάσμα (Σχήμα 7.13β.), διότι αυτό το κλάσμα περιέχει το υψηλότερο ποσοστό β-γλυκανών σε σχέση με τα άλλα δύο κλάσματα και με το συνολικό άλευρο βρώμης (Πίνακας 7.1.).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι τα υδρολύματα δεν επέδειξαν Νευτώνεια συμπεριφορά, διότι η τιμή του σύνθετου ιξώδους δεν ήταν σταθερή, αλλά μεταβαλλόταν αντιστρόφως ανάλογα με την αύξηση της συχνότητας. Το σύνθετο ιξώδες είχε την υψηλότερη τιμή για το χονδρόκοκκο κλάσμα (στην αρχή), σε σχέση με τις άλλες τρεις περιπτώσεις, αλλά στη συνέχεια, αυξανομένης της συχνότητας η τιμή του μειωνόταν με γρήγορο ρυθμό (Σχήμα 7.13β.). Αντιθέτως, το λεπτόκοκκο κλάσμα παρουσίασε μία εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Πιο συγκεκριμένα, το σύνθετο ιξώδες μειωνόταν ομαλά μέχρι να σημειωθεί μια ευθυγράμμιση της καμπύλης για ένα μικρό εύρος συχνοτήτων (Σχήμα 7.13δ.), αλλά στο τέλος σημείωσε αύξηση για υψηλές τιμές συχνοτήτων. Πρόκειται για μία αρκετά ενδιαφέρουσα περίπτωση, η οποία είναι εξαιρετικά πολύπλοκη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΙΙ

#### 8.1. Παρουσίαση αποτελεσμάτων

#### 8.1.1. <u>Παράμετροι απόδοσης μεμβρανών που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων</u> υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης

Στον Πίνακα 8.1. παρουσιάζονται οι παράμετροι απόδοσης των μεμβρανών που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης. Τα πειράματα διεξήχθησαν για τα δύο διαφορετικά συστήματα υπερδιήθησης (UF) (μονάδα UF σε συνδυασμό με τύπο μεμβράνης), για κάθε τιμή ασκούμενης δια-μεμβρανικής πίεσης (TMP). Η τιμή της πυκνότητας ροής για το καθαρό απιονισμένο νερό  $(J_{w0})$  αυξανόταν αυξανομένης της TMP, για κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Επίσης, οι τιμές της J<sub>w0</sub> παρουσίασαν έντονη διακύμανση ανάμεσα στις μεμβράνες (RC, PES και PS) στο κελί κάθετης ροής, και αυξάνονταν με αυτή τη σειρά: PS < RC < PES. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές πυκνότητας ροής του νερού ( $J_{w0}$ ) για τη μεμβράνη PES, ήταν πάνω από 4, 3 και 2 φορές πιο υψηλές σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν για τη μεμβράνη PS, στις πιέσεις 1, 2 και 3 bar, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, συγκρίνοντας τις ληφθήσες τιμές  $J_{w0}$  μεταξύ της μονάδας εφαπτομενικής ροής και του κελιού κάθετης ροής, παρατηρήθηκε μία μείωση στο διπλάσιο για τη μονάδα εφαπτομενικής ροής, για κάθε τιμή εξεταζόμενης πίεσης (TMP). Η τιμή της διαπερατότητας του νερού (L<sub>w0</sub>) μειωνόταν αυξανομένης της πίεσης (TMP) στο κελί κάθετης ροής (dead-end cell) για τις μεμβράνες RC και PES, ενώ αυξανόταν για την PS μεμβράνη και στις δύο μονάδες υπερδιήθησης.

Η πυκνότητα ροής του διηθήματος (J<sub>v</sub>) του 200 mg/L-πρότυπου διαλύματος, στο κελί κάθετης ροής, σημείωσε τις χαμηλότερες τιμές της για τις μεμβράνες RC και PS, ενώ τις υψηλότερες για την PES μεμβράνη. Επιπλέον, η πυκνότητα ροής του διηθήματος της PS μεμβράνης για τη μονάδα εφαπτομενικής ροής επέδειξε αισθητά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για το κελί κάθετης ροής, σε όλες τις εφαρμοζόμενες τιμές TMPs. Ωστόσο η διαπερατότητα του διαλύματος (L<sub>v</sub>) μειωνόταν για κάθε αύξηση της TMP, σε όλα τα πειράματα που έγιναν. Οι παράμετροι RF και FR παρουσίασαν αρκετά χαμηλές τιμές (5-8% και 9-11%, αντίστοιχα) για τις RC και PES μεμβράνες, σε κάθε εξεταζόμενη τιμή TMP. Η PS μεμβράνη κατείχε τουλάχιστον διπλάσιες τιμές FR (22-38%) και για τα δύο συστήματα υπερδιήθησης, σε σύγκριση με τις μεμβράνες RC και PES. Επιπρόσθετα, η PS μεμβράνη επέδειξε 1,5-3 φορές υψηλότερες τιμές FR
Σύστημα	TMP <sup>a</sup>	Νερό		Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων β-γλυκάνης (mg/L)											
(Μονάδα +				200				600				2000			
Μεμβράνη)		$J_{w0}^{b}$	$L_{w0}^{c}$	$J_v^d$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>	$RF^{f}$	FR <sup>g</sup>	$J_v^d$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>	$RF^{f}$	FR <sup>g</sup>	$J_v^d$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>	$RF^{f}$	FR <sup>g</sup>
	bar	L/h•m <sup>2</sup>	$(L/(h \cdot m^2))$	$L/h \cdot m^2$	$(L/(h \cdot m^2))$	%	%	L/h•m²	$(L/(h \cdot m^2))$	%	%	L/h•m²	$(L/(h \cdot m^2))$	%	%
			/bar		/bar				/bar				/bar		
Κάθετη ροή	1	$541 \pm 58^{k}$	$541 \pm 58^{k}$	$45 \pm 1^{k}$	$45 \pm 1^{k}$	$8 \pm 1^k$	$10 \pm 1^{k}$	$25 \pm 1^{k}$	$25 \pm 1^{k}$	$5 \pm 1^{k}$	$5 \pm 1^{k}$	$20 \pm 4^{k}$	$20 \pm 4^{k,1}$	$4 \pm 1^{k}$	$4 \pm 1^{k}$
$+ RC^{h}$	2	$816 \pm 37^{1}$	$408 \pm 18^{1}$	$45 \pm 2^{k}$	$23 \pm 1^{1}$	$6 \pm 1^{1}$	$10 \pm 1^{k}$	$39 \pm 5^{1}$	$20 \pm 3^{1}$	$5 \pm 1^k$	$6 \pm 1^{k, l}$	$31 \pm 4^{1}$	$15 \pm 2^{k, m}$	$4 \pm 1^k$	$5 \pm 1^k$
	3	$950\pm21^{m}$	$317\pm7^{m}$	$47 \pm 1^{k}$	$16 \pm 1^{m}$	$5 \pm 1^{1}$	$11 \pm 2^{k}$	$43 \pm 7^{1}$	$14 \pm 2^m$	$5 \pm 1^k$	$7 \pm 1^{l, m}$	$38 \pm 3^{1}$	$13 \pm 1^{m}$	$4 \pm 1^k$	$7 \pm 1^{1}$
Κάθετη ροή	1	$925\pm 39^{m}$	$925\pm 39^n$	$54 \pm 3^{1}$	$54 \pm 3^n$	$6 \pm 1^{1}$	$9 \pm 1^{k}$	$37 \pm 4^{l, m}$	$37 \pm 4^n$	$4 \pm 1^k$	$8 \pm 1^{m}$	$36 \pm 3^{1}$	$36 \pm 3^n$	$4 \pm 1^k$	$6 \pm 1^{k, l}$
$+ PES^{i}$	2	$1266 \pm 65^{n}$	$633 \pm 32^{\circ}$	$72 \pm 5^{m}$	$36 \pm 2^{\circ}$	$6 \pm 1^{1}$	$10 \pm 2^{k}$	$56 \pm 3^n$	$28 \pm 2^k$	$4 \pm 1^k$	$8 \pm 1^m$	$51 \pm 3^{m}$	$26 \pm 2^{1}$	$4 \pm 1^k$	$7 \pm 1^{1}$
	3	$1547 \pm 92^{\circ}$	$516 \pm 31^{k}$	$94\pm4^{n}$	$31 \pm 1^{p}$	$6 \pm 1^{1}$	$10 \pm 1^{k}$	$75\pm3^{\circ}$	$25 \pm 1^{k}$	$5 \pm 1^k$	$8 \pm 1^m$	$65 \pm 7^{n}$	$22 \pm 2^{1}$	$4 \pm 1^k$	$6 \pm 1^{k, l}$
Κάθετη ροή	1	$193 \pm 23^{p}$	$193 \pm 23^{p}$	$57 \pm 7^{1}$	$57 \pm 7^{n}$	$29 \pm 2^{m}$	$38 \pm 1^{1}$	$31 \pm 6^{m}$	$31 \pm 6^{n}$	$16 \pm 1^{1}$	$27 \pm 5^{n}$	$13 \pm 3^{\circ}$	$13 \pm 3^{m}$	$7 \pm 1^{1}$	$13 \pm 1^{m}$
$+ PS^k$	2	$398\pm26^{q}$	$199 \pm 13^{p}$	$56 \pm 7^{1}$	$28 \pm 4^p$	$14 \pm 1^{n}$	$30\pm5^{m}$	$41 \pm 12^{l, n}$	$21 \pm 6^{l, k}$	$10 \pm 2^{m}$	$20\pm3^n$	$10 \pm 3^{\circ}$	$5 \pm 1^p$	$3 \pm 1^k$	$9 \pm 1^{1}$
	3	$665 \pm 25^{r}$	$222\pm8^{q}$	$53 \pm 3^{1}$	$18 \pm 1^q$	$8 \pm 1^k$	$22 \pm 2^n$	$61\pm9^n$	$20 \pm 3^{1}$	$9 \pm 1^m$	$17 \pm 3^{\circ}$	$11 \pm 4^{o, p}$	$4 \pm 1^{o, p}$	$2 \pm 1^k$	$7 \pm 1^{1}$
Εφαπτομενική	1	$63 \pm 9^{\rm s}$	$63 \pm 9^{\rm r}$	$23 \pm 4^{\circ}$	$23 \pm 4^{1}$	$37 \pm 2^{\circ}$	$51 \pm 5^{\circ}$	$17 \pm 1^{p}$	$17 \pm 1^{\circ}$	$27 \pm 5^{n}$	$31 \pm 10^{n}$	$2 \pm 1^q$	$2 \pm 1^p$	$4 \pm 1^k$	$4 \pm 1^{k}$
$\rho o \eta + P S^k$	2	$201 \pm 21^{p}$	$100 \pm 10^{\rm s}$	$38\pm3^{\text{p}}$	$19 \pm 2^{q}$	$19 \pm 1^{p}$	$72 \pm 2^{p}$	$25\pm3^k$	$13 \pm 1^{m}$	$13 \pm 2^{m}$	$57 \pm 4^p$	$15 \pm 1^{p}$	$8 \pm 1^q$	$8 \pm 1^1$	$8 \pm 1^1$
	3	$374\pm34^{\text{q}}$	$125 \pm 11^{t}$	$45 \pm 2^k$	$15 \pm 1^{m}$	$12 \pm 1^{n}$	$63 \pm 2^q$	$27\pm3^k$	$9 \pm 1^p$	$7 \pm 1^{\circ}$	$79 \pm 15^{q}$	$16 \pm 1^{p}$	$5 \pm 1^{\circ}$	$4 \pm 1^k$	$4 \pm 1^k$

Πίνακας 8.1. Παράμετροι απόδοσης μεμβράνης που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n* = 3).

<sup>a</sup> "TMP" για τη "δια-μεμβρανική πίεση".

<sup>b</sup> "J<sub>w0</sub>" για την "πυκνότητα ροής του καθαρού νερού" σε σταθερή κατάσταση, πριν την έναρξη των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα.

 $^{c}$  "Lw0" για την "διαπερατότητα του νερού", σε μόνιμες συνθήκες.

 $^d$  " $J_v$ " για την "πυκνότητα ροής του διηθήματος", σε μόνιμες συνθήκες.

 $^{\rm f}$  "RF" για τη "σχετική ροή" των διαλυμάτων τροφοδοσίας.

 $^{g}$  "FR" για την "ανάκτηση ροής".

<sup>h</sup> "RC" για την "αναγεννημένη κυτταρίνη".

<sup>I</sup> "PES" για την "πολυαιθεροσουλφόνη".

<sup>j</sup> "PS" για την "πολυσουλφόνη".

<sup>k-s</sup> Οι τιμές με το ίδιο αγγλικό γράμμα (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ( $P \le 0.05$ ).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα για το 600 mg/L-πρότυπο διάλυμα, η J<sub>v</sub> αυξανόταν ανάλογα με την αύξηση της TMP, για κάθε πείραμα σε αυτή τη συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, τις υψηλότερες τιμές J<sub>v</sub> παρουσίασε η PES για κάθε τιμή εφαρμοζόμενης TMP. Ωστόσο, οι τιμές της J<sub>v</sub> για την PS μεμβράνη στο σύστημα εφαπτομενικής ροής ήταν αρκετά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για την ίδια μεμβράνη στο κελί κάθετης ροής. Οι τιμές διαπερατότητας L<sub>v</sub> ακολούθησαν την αντίστροφη τάση ως προς την πυκνότητα ροής, καθώς μειωνόταν αυξανομένης της TMP. Επιπλέον, οι τιμές της L<sub>v</sub> για τη μεμβράνη PS στη μονάδα εφαπτομενικής ροής ήταν αισθητά χαμηλότερες όταν συγκρίνονταν με τις αντίστοιχες τιμές για το κελί κάθετης ροής. Όμοια με το 200 mg/L-πρότυπο διάλυμα, οι τιμές RF και FR των μεμβρανών RC και PES ήταν πολύ χαμηλές (4-5% και 5-8%, αντίστοιχα), ενώ οι αντίστοιχες τιμές της μεμβράνης PS στο κελί κάθετης ροής ήταν τουλάχιστον διπλάσιες (9-16% και 17-27%, αντίστοιχα), για κάθε τιμή ΤΜΡ. Η εφαρμογή της PS μεμβράνης στο σύστημα εφαπτομενικής ροής επέδειξε ακόμη υψηλότερες τιμές FR (31-79%), οι οποίες αυξάνονταν ανάλογα με κάθε αύξηση της TMP. Όσον αφορά τις τιμές της RF, ήταν όμοιες με τις αντίστοιχες τιμές που λήφθηκαν για το κελί κάθετης ροής για τον ίδιο τύπο μεμβράνης, με εξαίρεση την τιμή πίεσης του 1 bar, όπου η RF ήταν σημαντικά υψηλότερη στο σύστημα εφαπτομενικής ροής (27% αντί για 16%).

Στο διάλυμα με την υψηλότερη συγκέντρωση (2000 mg/L), οι υψηλότερες τιμές  $J_v$  και  $L_v$ λήφθηκαν για τη μεμβράνη PES, σε κάθε εφαρμοζόμενη τιμή TMP. Οι πυκνότητες ροής του διηθήματος για τις RC και PES παρουσίασαν αύξηση καθώς η TMP αυξανόταν, σε αντίθεση με τις τιμές της  $L_v$  που μειωνόταν. Απεναντίας, οι μεμβράνες PS παρουσίασαν αρκετά χαμηλές τιμές  $J_v$  και  $L_v$  [2-16 L/h·m<sup>2</sup> και 2-13 (L/(h·m<sup>2</sup>))/bar, αντίστοιχα], και για τα δύο συστήματα υπεδιήθησης. Τέλος, οι τιμές RF και FR ήταν πολύ χαμηλές (2-7% και 4-13%), σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

#### 8.1.2. <u>Συντελεστές συγκράτησης στα πειράματα υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-</u> <u>γλυκάνης</u>

Οι συντελεστές συγκράτησης που υπολογίστηκαν στα πειράματα υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης συναρτήσει διαφορετικών συστημάτων υπερδιήθησης και τιμών TMP, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2. Μεταξύ των τριών τύπων μεμβρανών που εφαρμόστηκαν στο κελί κάθετης ροής, η μεμβράνη RC παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές συγκράτησης (>87%). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση (87-95%) μεταξύ των διαφορετικών τιμών TMP, για κάθε συγκέντρωση. Από την άλλη μεριά, η PES μεμβράνη σημείωσε τις χαμηλότερες

τιμές (<81%), παρότι δεν διέφερε σε μεγάλο βαθμό, εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες τιμές για τη μεμβράνη PS στο κελί κάθετης ροής. Η PS μεμβράνη παρουσίασε αρκετά χαμηλές τιμές συντελεστών συγκράτησης (69-75%) για το 200 mg/L-πρότυπο διάλυμα, αλλά οι τιμές συγκράτησης για τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις (600 και 2000 mg/L) δεν διέφεραν αισθητά από τις αντίστοιχες τιμές που λήφθηκαν για τη μεμβράνη RC (εκτός από τις τιμές συγκράτησης για το 600 mg/L-πρότυπο διάλυμα, σε τιμή πίεσης 1 bar). Σε αντίθεση, οι συντελεστές συγκράτησης για τη μεμβράνη PS στο σύστημα εφαπτομενικής ροής παρουσίασαν ικανοποιητικά υψηλές τιμές (91-95%) σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση μεταξύ των τιμών συγκράτησης, για κάθε διαφορετική τιμή ασκούμενης πίεσης.

**Πίνακας 8.2.** Συντελεστές συγκράτησης για τα πειράματα υπερδιήθησης κατά την εφαρμογή των πρότυπων διαλυμάτων βγλυκάνης. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n* = 3).

Σύστημα	TMP <sup>a</sup>	Συντελεστής συγκράτησ	ης <sup>ь</sup> (%) των πρότυπων δ	ιαλυμάτων β-γλυκάνης
(Μονάδα + Μεμβράνη)	bar	200 mg/L	600 mg/L	2000 mg/L
Κάθετη ροή+ RC <sup>c</sup>	1	$93 \pm 1^{f}$	$95 \pm 1^{f, g}$	$93 \pm 1^{f, g}$
	2	$91 \pm 3^{f}$	$91 \pm 3^{g, h}$	$91 \pm 2^{f}$
	3	$94 \pm 1^{f}$	$87 \pm 2^{h}$	$89 \pm 2^{\mathrm{f}}$
Κάθετη ροή + PES <sup>d</sup>	1	$75 \pm 2^{g}$	$74 \pm 2^{i}$	$81 \pm 3^{h}$
	2	$59 \pm 3^{h}$	$65 \pm 3^{j}$	$74 \pm 4^{i}$
	3	$57 \pm 3^{h}$	$62 \pm 2^{k}$	$68 \pm 4^{j}$
Kάθετη ροή + PS <sup>e</sup>	1	$72 \pm 6^{g}$	$86 \pm 5^{h}$	$88 \pm 4^{\mathrm{f}}$
	2	$69 \pm 7^{g, h}$	$87 \pm 1^{h}$	$90 \pm 4^{\rm f}$
	3	$75 \pm 6^{\mathrm{g}}$	$90 \pm 2^{\rm h}$	$89 \pm 3^{\mathrm{f}}$
Εγκάρσια ροή+ PS <sup>e</sup>	1	$93 \pm 1^{f}$	$93 \pm 1^{h}$	$94 \pm 1^{g, k}$
	2	$94 \pm 1^{\mathrm{f}}$	$91 \pm 3^{h}$	$95 \pm 1^{g, k}$
	3	$93 \pm 1^{\mathrm{f}}$	$92 \pm 1^{h}$	$95 \pm 1^{g, k}$

<sup>a</sup> "TMP" για "δια-μεμβρανική πίεση".

<sup>b</sup> Συντελεστής συγκράτησης =  $100 \cdot (A_{\text{feed}} - A_{\text{perm}})/A_{\text{feed}}$ , όπου  $A_{\text{feed}}$  και  $A_{\text{perm}}$  είναι οι τιμές κάθε παραμέτρου για το διάλυμα τροφοδοσίας και το διήθημα, αντίστοιχα.

<sup>c</sup> "RC" για την "αναγεννημένη κυτταρίνη".

d "PES" για την "πολυαιθεροσουλφόνη".

e "PS" για την "πολυσουλφόνη".

 $f^{-k}$ Οι τιμές με το ίδιο αγγλικό γράμμα (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ( $P \le 0,05$ ).

#### 8.1.3. <u>Χαρακτηρισμός των διαλυμάτων τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο</u> <u>βρώμης</u>

Η σύσταση των τριών διαλυμάτων τροφοδοσίας (A, B & C) που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.3. Τα διαλύματα τροφοδοσίας προέκυψαν κατόπιν εκχύλισης σε τρεις διαφορετικές αναλογίες μάζας στερεού αποβλήτου/υδατικού διαλύματος (1/5, 1/7,5 και 1/10). Το pH των διαλυμάτων τροφοδοσίας ήταν όξινο (4,5±0,1), για το λόγο ότι ρυθμίστηκε καταλλήλως κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επίσης, τα διαλύματα τροφοδοσίας προέκυψαν

της προσθήκης ιόντων (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και HCl) για τη ρύθμιση του pH. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις υψηλές συγκεντρώσεις νατρίου (931-1445 mg/L) εν συγκρίσει με αυτές του καλίου.

Παράμετρος	Μονάδα	Διάλυμα τροφοδοσίας				
		А	В	С		
Αναλογία εκχύλισης	g/mL	1/5	1/7,5	1/10		
Ολικά σάκχαρα	mg/L	$5786\pm203$	$4302\pm226$	$2619 \pm 116$		
β-γλυκάνες	mg/L	$442 \pm 23$	$370 \pm 13$	$302 \pm 20$		
Ολικά σάκχαρα (χωρίς β- γλυκάνες)	mg/L	5344 ± 181	$3932 \pm 217$	$2317 \pm 96$		
Πρωτεΐνες	mg/L	$376\pm16$	$260 \pm 21$	$190 \pm 13$		
Ολικές φαινόλες	mg/L	$31 \pm 3$	$23 \pm 1$	$16 \pm 2$		
Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)	mg/L	$10475\pm76$	$7654 \pm 31$	$4785 \pm 35$		
Νάτριο	mg/L	$1445\pm40$	$1257\pm46$	931 ± 19		
Κάλιο	mg/L	$254 \pm 21$	$184 \pm 8$	$126 \pm 7$		
Αγωγιμότητα	mS/cm	$6,\!44 \pm 0,\!05$	$4,95 \pm 0,03$	$3,67 \pm 0,02$		

**Πίνακας 8.3.** Χαρακτηριστικά των διαλυμάτων τροφοδοσίας, τα οποία ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n* = 3).

Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε κάλιο ήταν χαμηλότερη και κυμαινόταν μεταξύ 126 και 254 mg/L. Το οργανικό φορτίο ήταν αρκετά υψηλό όπως επιβεβαιώνεται από τις τιμές του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου, οι οποίες έφτασαν την κλίμακα των g/L (4,8-10,5). Τα οργανικά συστατικά που ενδεχομένως περιέχονται στα διαλύματα τροφοδοσίας είναι υδατάνθρακες, φυτικές ίνες και πρωτεΐνες (Πίνακας 6.1., Κεφ.6.). Ανάμεσα στα οργανικά συστατικά που προσδιορίστηκαν (Πίνακας 8.3.), τα ολικά σάκχαρα σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές (2619-5786 mg/L), ενώ οι πρωτεΐνες και οι ολικές φαινόλες παρουσιάσαν αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις (190-376 και 16-31 mg/L, αντίστοιχα). Όσον αφορά τη συγκέντρωση των βγλυκανών (302-442 mg/L) στα διαλύματα τροφοδοσίας, αποτέλεσε μόλις το ~10% του συνολικού ποσοστού σε ολικά σάκχαρα. Το παραπάνω εύρος για τις τιμές των β-γλυκανών έρχεται σε αντιστοιχία με τις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις (200 και 600 mg/L) των πρότυπων διαλυμάτων β-γλυκάνης που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα. Δεδομένου ότι το πραγματικό απόβλητο βρώμης περιείχε περίπου 9 g πρωτεϊνών και 3 g βγλυκάνης/100g (Πίνακας 6.1., Κεφ.6.), το αντίστοιχο επίπεδο ανάκτησης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης κυμαινόταν περίπου μεταξύ 2-3% και 8-10%, αντίστοιχα.

#### 8.1.4. <u>Παράμετροι απόδοσης που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια πειραμάτων υπερδιήθησης για τα</u> διαλύματα που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης

Στον Πίνακα 8.4. παρουσιάζονται οι παράμετροι απόδοσης που μελετήθηκαν, με ιδιαίτερη έμφαση στην πυκνότητα ροής και στη διαπερατότητα των μεμβρανών, έχοντας ως διαλύματα τροφοδοσίας τα διαλύματα που ανακτήθηκαν από το αποβλήτο βρώμης, για διαφορετικές τιμές πιέσεων (TMPs).

Πίνακας 8.4. Παράμετροι απόδοσης που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη μεμβράνη πολυσουλφόνης (PS) στο σύστημα εφαπτομενικής ροής.

TMP <sup>a</sup>	P <sup>a</sup> Νερό		Συγκέντρωση των διαλυμάτων β-γλυκάνης (mg/L)							
			А		В		С			
	$J_{w0}^{b}$	L <sub>w0</sub> <sup>c</sup>	$J_v^{d}$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>	$J_v^{d}$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>	$J_v^d$	L <sub>v</sub> <sup>e</sup>		
Bar	$L/h \cdot m^2$	$(L/(h \cdot m^2))/bar$	$L/h \cdot m^2$	$(L/(h \cdot m^2))/bar$	$L/h \cdot m^2$	$(L/(h \cdot m^2))/bar$	$L/h \cdot m^2$	$(L/(h \cdot m^2))/bar$		
1	$43 \pm 17^{\rm f}$	$43 \pm 17^{\mathrm{f}}$	$10 \pm 4^{\rm f}$	$10 \pm 4^{f, g}$	$27 \pm 13^{\mathrm{f}}$	$27\pm13^{f,g}$	$24\pm7^{\rm f}$	$24\pm7^{\mathrm{f}}$		
2	$188 \pm 37^{\mathrm{g}}$	$94\pm18^{\text{g}}$	$38\pm11^{\text{g}}$	$19\pm 6^{g,h}$	$97\pm25^{\text{g}}$	$49\pm12^{g,h}$	$116 \pm 22^{\text{g}}$	$58\pm11^{\text{g}}$		
3	$413\pm59^{\rm h}$	$138\pm20^{h}$	$55\pm2^{\rm h}$	$18 \pm 1^{\rm h}$	$232\pm59^{\rm h}$	$77\pm20^{\rm h}$	$257\pm21^{\rm h}$	$86\pm7^{\rm h}$		

<sup>a</sup> "TMP" για "δια-μεμβρανική πίεση".

<sup>b</sup> " $J_{w0}$ " για την "πυκνότητα ροής του καθαρού νερού" σε σταθερή κατάσταση, πριν την έναρξη των πειραμάτων υπερδιήθησης για τα διαλύματα τροφοδοσίας.

 $^{\rm c}$  "L\_w0" gia th "diaperatóthta tou neroú", se mónimes sundúkes.

 $^{d}$  "J<sub>v</sub>" για την "πυκνότητα ροής του διηθήματος", σε μόνιμες συνθήκες.

 $^{e}$  "L\_" για τη "διαπερατότητα του διαλύματος τροφοδοσίας", σε μόνιμες συνθήκες.

<sup>f-h</sup> Οι τιμές με το ίδιο αγγλικό γράμμα (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές  $(P \le 0.05)$ .

Oi tiµές  $J_{w0}$  and  $L_{w0}$  είναι πολύ κοντά µε τις αντίστοιχες τιµές που λήφθηκαν στο σύστηµα εφαπτοµενικής ροής για τη µεµβράνη PS, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1. Οι πυκνότητες ροής των διαλυµάτων τροφοδοσίας ήταν µη αναµενόµενα υψηλές σε σύγκριση µε τα πρότυπα διαλύµατα β-γλυκάνης, ειδικότερα στην πιο υψηλή τιµή TMP (3 bar). Για παράδειγµα, οι τιµές της  $J_v$  για τα διαλύµατα τροφοδοσίας κυµαινόταν µεταξύ 55 έως 257 L/h·m<sup>2</sup> στα 3 bar (Πίνακας 8.4.), σε αντίθεση µε το εύρος, 27 έως 45 L/h·m<sup>2</sup> (Πίνακας 8.1.), για τα πρότυπα διαλύµατα β-γλυκάνης συγκεντρώσεων 600 και 200 mg/L, αντίστοιχα. Επιπλέον, η διαπερατότητα για τα διαλύµατα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώµης δεν µειώθηκε αυξανοµένης

της TMP, όπως παρατηρήθηκε στα πειράματα υπερδιήθησης για τα πρότυπα διαλύματα βγλυκάνης.

#### 8.1.5. Συντελεστές συγκράτησης στα πειράματα υπερδιήθησης για τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβλητο βρώμης

Οι συντελεστές συγκράτησης που υπολογίστηκαν για διάφορες παραμέτρους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπερδιήθησης, με διάλυμα τροφοδοσίας το διάλυμα που ανακτήθηκε από το στερεό απόβλητο βρώμης, σε τιμή πίεσης των 2 bar, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.5.

**Πίνακας 8.5.** Συντελεστές συγκράτησης που υπολογίστηκαν για διάφορες παραμέτρους, κατά την εφαρμογή των διαλυμάτων τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το στερεό απόβητο βρώμης. Τα πειράματα διεξήχθησαν με μεμβράνη πολυσουλφόνης (PS) στο σύστημα εφαπτομενικής ροής, εφαρμόζοντας τη βέλτιστη δια-μεμβρανική πίεση των 2 bar. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο  $\pm$  τυπική απόκλιση (n = 3).

Παράμετρος	Τιμές <sup>b</sup> του συντελεστή συγκράτησης <sup>a</sup> (%) για κάθε διάλυμα τροφοδοσίας					
	А	В	С			
Αναλογία εκχύλισης	1/5	1/7,5	1/10			
Ολικά σάκχαρα	$15 \pm 1^{b}$	$13 \pm 4^{b, c}$	$10 \pm 3$ <sup>c</sup>			
β-γλυκάνες	$67 \pm 7^{b}$	$62\pm9^{b,c}$	$53 \pm 3^{\circ}$			
Ολικά σάκχαρα (χωρίς β- γλυκάνες)	$11 \pm 2^{b}$	$8\pm5^{b,c}$	$4 \pm 3^{\circ}$			
Πρωτεΐνες	$40\pm8^{b}$	$36 \pm 7^{b}$	$35\pm6^{b}$			
Ολικές φαινόλες	$9\pm3$ <sup>b</sup>	$3\pm2^{\circ}$	$9\pm3$ <sup>b</sup>			
Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο	$14 \pm 1^{b}$	$9 \pm 1^{\circ}$	$9 \pm 1^{\circ}$			
Νάτριο	<1 <sup>b</sup>	$2 \pm 1^{b}$	<1 <sup>b</sup>			
Κάλιο	$3 \pm 2^{b}$	$2\pm2^{b}$	$2 \pm 1^{b}$			
Αγωγιμότητα	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>			

<sup>a</sup> Συντελεστής συγκράτησης =  $100 \cdot (A_{\text{feed}} - A_{\text{perm}}) / A_{\text{feed}}$ , όπου  $A_{\text{feed}}$  και  $A_{\text{perm}}$  είναι οι τιμές κάθε παραμέτρου για το διάλυμα τροφοδοσίας και το διήθημα, αντίστοιχα.

<sup>b-c</sup> Οι τιμές με το ίδιο αγγλικό γράμμα (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ( $P \le 0.05$ ).

Γενικά, οι συντελεστές συγκράτησης δεν είχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα τρία διαλύματα τροφοδοσίας. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα διαλύματα B και C μεταξύ τους ως προς τη συγκράτησή τους, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση (εκτός από τους συντελεστές συγκράτησης για τις ολικές φαινόλες). Η συγκράτηση των β-γλυκανών ήταν αρκετά ικανοποιητική (53-67%), ωστόσο ήταν χαμηλότερη σε σχέση με το αντίστοιχο

ποσοστό για τα πρότυπα διαλύματα (91-95%, Πίνακας 8.2.). Η συγκράτηση των πρωτεϊνών ήταν σημαντική (35-40%). Όσον αφορά τη συγκράτηση των ολικών σακχάρων, των ολικών σακχάρων πλην των β-γλυκανών, του οργανικού φορτίου (Χημικώς Απαιτούμενο Οξυγόνο) και των ολικών φαινολών, ήταν αρκετά χαμηλή (<15%). Τέλος, η συγκράτηση των ιόντων ήταν ασήμαντη (<3%).

#### 8.2. Σχολιασμός των Αποτελεσμάτων

#### 8.2.1. Επεξεργασία των β-γλυκανών με μεμβράνες υπερδιήθησης διαφερετικού τύπου

Ο μηχανισμός του "σουρώματος" (sieving mechanism) (και συνεπακολούθως το "μοριακό κατώφλι", MWCO, των μεμβρανών) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φαινόμενα που επηρεάζουν τις διεργασίες της υπερδιήθησης. Ωστόσο, η επίδραση του MWCO είναι μικρότερη όταν η διαλυτότητα των διαλυμάτων συσχετίζεται με την υδροφοβικότητα των μεμβρανών (Gekas et al., 1993, Pinelo et al., 2009). Στην παρούσα διατριβή, τρεις τύποι μεμβρανών (RC, PES, PC) του ίδιου MWCO (100kDa) αλλά διαφορετικής πολικότητας, εφαρμόστηκαν για την υπερδιήθηση των μορίων της β-γλυκάνης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1. (Κεφ. 6.), η RC περιέχει διάφορες υδροξυλομάδες γύρω από τους αρωματικούς δακτυλίους, γι' αυτό και είναι η περισσότερο υδρόφιλη μεταξύ των άλλων μεμβρανών. Η PS αποτελείται από διαδογικούς αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι παρέχουν έναν υδρόφοβο χαρακτήρα στο μόριο. Όσον αφορά την PES, επιδεικνύει μέτρια υδροφοβικότητα εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων μορίων του διοξειδίου του θείου τα οποία δύνανται να δεσμεύσουν το νερό με δεσμούς υδρογόνου, παρέχοντας δύο ζεύγη αδέσμευτων ηλεκτρονίων από τα άτομα οξυγόνου. Από την άλλη μεριά, οι β-γλυκάνες των δημητριακών είναι γραμμικοί ομοπολυσακχαρίτες, αποτελούμενοι από επαναλαμβανόμενα τμήματα β-D-γλυκόζης ενωμένα με  $(1 \rightarrow 4)$ -δεσμούς, τα οποία διακόπτονται από  $(1 \rightarrow 3)$  δεσμούς. Η ύπαρξη των β- $(1 \rightarrow 3)$  δεσμών εμποδίζει την αναδίπλωση της γλυκοζιτικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα τη αύξηση της διαλυτότητας του μορίου (Lazaridou et al., 2007). Με βάση αυτή τη δομή, δύο χαρακτηριστικά είναι καθοριστικής σημασίας για τη συμπεριφορά των β-γλυκανών κατά τη διεργασία της υπερδιήθησης: (α) ο μεγάλος όγκος των μορίων που εμποδίζει τη διάχυσή τους διαμέσου των μικρότερων πόρων, και (β) η παρουσία μεγάλου αριθμού υδροξυλομάδων που επιτρέπουν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τον διαλύτη (νερό) και τη μεμβράνη, ειδικότερα εάν η μεμβράνη είναι υδρόφιλη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να εξηγηθούν με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα, η πυκνότητα ροής του νερού και η διαπερατότητα παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές για την PS, και υψηλότερες τιμές για την PES (Πίνακας 8.1.). Πιο συγκεκριμένα, τα υδρόφοβα μόρια της PS απωθούν τα μόρια του νερού, επιβραδύνοντας τη διάχυσή τους διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Η μεμβράνη PES είναι λιγότερο υδρόφοβη, με αποτέλεσμα να επιτρέπει στα μόρια του νερού να διαχέονται πιο γρήγορα διαμέσου των πόρων. Αντίθετα, η RC είναι υδρόφιλη, οπότε αναμενόταν να επιδείξει αρκετά υψηλότερες τιμές πυκνότητας ροής (για το νερό) και διαπερατότητας σε σύγκριση με την υδρόφοβη PES. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές των  $J_{w0}$  και  $L_{w0}$  ήταν χαμηλότερες σε αυτή την περίπτωση. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να αποτελέσει το γεγονός ότι η RC είναι αρκετά υδρόφιλη ώστε να προσροφά ή να δεσμεύει μόρια νερού, εμποδίζοντας τη ροή του διηθήματος. Σχετικά με αυτή την υπόθεση, οι Huisman et al. (1997) ανέφεραν ότι η διαπερατότητα του νερού για την υδρόφοβη PS μεμβράνη κατείχε υψηλότερες τιμές όταν συγκρίθηκε με την υδρόφιλη μεμβράνη οξεϊκής κυτταρίνης (και οι δύο μεμβράνες είχαν το ίδιο MWCO, ίσο με 100 kDa).

Δεδομένου ότι οι β-γλυκάνες είναι αρκετά διαλυτές και παρουσιάζουν αυξημένη πολικότητα, τα μόρια του νερού αναμένονται να τις περιβάλλουν επαρκώς εντός των αντίστοιγων διαλυμάτων. Έτσι, ο όγκος των μελετηθέντων μορίων (β-γλυκανών) αυξάνεται και η διήθηση διαμέσου των πόρων της μεμβράνης γίνεται δυσκολότερη. Ωστόσο, οι β-γλυκάνες διατηρούν την πολικότητά τους και λογικά θα έπρεπε να παρουσιάζουν όμοια συμπεριφορά με εκείνη των μορίων του νερού κατά τη διαδικασία της υπερδιήθησης. Η θεώρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η PES μεμβράνη παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές πυκνότητας ροής και διαπερατότητας για τα τρία πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης, όπως και για το νερό. Σε σχέση με την PS μεμβράνη, αυτή δε σημείωσε τις χαμηλότερες τιμές για τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων (200 και 600 mg/L). Η παραπάνω ένδειξη θα μπορούσε να συσχετισθεί με τον μεγάλο όγκο των μορίων της β-γλυκάνης, τα οποία προκαλούν μείωση στην ταχύτητα διήθησης διαμέσου των πόρων της RC με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ταχύτητα προσρόφησής τους στην επιφάνεια της μεμβράνης. Επιπλέον, η φύση του υλικού κατασκευής των RC και PS θα μπορούσε να επηξηγήσει περαιτέρω την παραπάνω παρατήρηση. Για παράδειγμα, η RC έχει μικρό εύρος κατανομής μεγέθους πόρων, ενώ η PS είναι σε γενικές γραμμές περισσότερο ασύμμετρη (Gekas et al., 1993). Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι οι πόροι της PS είναι συνήθως μεγαλύτεροι ή μικρότεροι σε σχέση με το προβλεπόμενο μέγεθος του MWCO. Αυτό το γαρακτηριστικό θα μπορούσε να αυξήσει την ταχύτητα διήθησης για τα μεγαλύτερα μόρια διαμέσου των πόρων της PS, δεδομένου ότι μπορούν να μετακινηθούν μέσα στα "κενά" της μεμβράνης, περνώντας κατ' αυτό τον τρόπο πιο γρήγορα στο ρεύμα του διηθήματος. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι αποκτηθείσες τιμές της RF για την PS ήταν αρκετά υψηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για την RC μεμβράνη. Επιπρόσθετα, οι τιμές της RF για τις μεμβράνες RC και PES ήταν σχεδόν ίσες για όλες τις συγκεντρώσεις και για κάθε διαφορετική τιμή ασκούμενης TMP, αποδεικνύοντας ότι φαινόμενα αλληλεπίδρασης μεταξύ διαλύματος-μεμβράνης παρατηρήθηκαν κυρίως για τις μεμβράνες PS.

Ωστόσο, η παραπάνω παρατήρηση δεν μπορεί να επιβεβαιώσει τις χαμηλότερες τιμές πυκνότητας ροής που λήφθηκαν για την PS (αντί της RC), όταν εφαρμόστηκε το πυκνότερο πρότυπο διάλυμα β-γλυκάνης (2000 mg/L). Σε αυτή την περίπτωση, τα φαινόμενα πόλωσης συγκέντρωσης αποτελούν ρυθμιστικό παράγοντα αφού προσφέρουν μία πρόσθετη αντίσταση στη ροή του διηθήματος διαμέσου της PS, αποτελώντας ανασταλτικό παράγοντα στη διεργασία της υπερδιήθησης. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση της πόλωσης συγκέντρωσης επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι αυξανομένης της TMP, η τιμή της πυκνότητας ροής δε μεταβαλλόταν σημαντικά για το 2000 mg/L-πρότυπο διάλυμα και την PS. Επιπλέον, οι τιμές της RF ήταν αρκετά χαμηλές (<13%) για τον προαναφερθέντα συνδυασμό μεμβράνης-πρότυπου διαλύματος, επιδεικνύοντας μία πιθανή εναπόθεση των β-γλυκανών πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης λόγω της αυξημένης πόλωσης συγκέντρωσης. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (200-600 mg/L), οι τιμές της FR για την PS ήταν πολύ υψηλότερες (17-38%) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για τις RC και PES (5-8%). Το τελευταίο αποτέλεσμα θεωρήθηκε και ως το σημαντικότερο πλεονέκτημα της υδρόφοβης PS για το λόγο ότι η υδρόφιλη RC αλλά και η λιγότερο υδρόφοβη μεμβράνη (PES) προσρόφησαν πιθανώς τις β-γλυκάνες στην επιφάνειά τους, προκαλώντας μείωση της απόδοσής τους (fouling). Για παράδειμα, οι Maximous et al. (2009) ανέφεραν ότι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες προκάλεσαν μη-αντιστρεπτή και αντιστρεπτή μείωση της απόδοσης (fouling) όταν εφάρμοσαν RC και PES μεμβράνες, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, οι Kwon et al. (2009) ανέφεραν πρόσφατα ότι πολυσακχαρίτες όπως το αλγινικό και αβιετικό οξύ προκαλούν αντιστρεπτό φράξιμο (fouling) στην επιφάνεια της RC και μη αντιστρεπτό φράξιμο στην PES, αντίστοιχα.

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι συντελεστές συγκράτησης για τους διαφορετικούς τύπους μεμβρανών (Πίνακας 8.2.) παρουσίασαν λίγο-πολύ μία αντίστροφη τάση σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των πυκνοτήτων ροής. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη με τις χαμηλότερες τιμές πυκνότητας ροής (RC) παρουσίασε τους υψηλότερους συντελεστές συγκράτησης (>87%), για όλες τις μελετούμενες συγκεντρώσεις. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε την "αντίσταση πολικότητας" των β-γλυκανών πάνω στην επιφάνεια των υδρόφιλων RC μεμβρανών, καθώς και

την παγίδευσή τους στο εσωτερικό των πόρων της μεμβράνης. Παρά το γεγονός της ελλιπούς βιβλιογραφίας σε θέματα που αφορούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ σακχαριτών και υλικών μεμβρανών, είναι αναμενόμενο ότι η αρνητική πολικότητα των σακχαριτών (η οποία αποδεικνύεται από τον μεγάλο αριθμό υδροξυλομάδων) σε ασθενές όξινο περιβάλλον αποτέλεσε παράγοντα καθοριστικής σημασίας για την αντίσταση πολικότητας, όπως και στην περίπτωση της απομεθυλιωμένης πηκτίνης (Pinelo et al., 2009). Η επιλεκτικότητα της RC μειώθηκε για τις υψηλές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων (600 και 2000 mg/L) σε υψηλή TMP (3 bar), πιθανότατα λόγω της αυξημένης διαμεμβρανικής διάχυσης που ασκείται από την πίεση. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για την PES σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, οι συντελεστές συγκράτησης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των εφαρμοζόμενων τιμών TMP. Η αυξητική τάση των τιμών της πυκνότητας ροής για την PES προκάλεσε μία μείωση στα ποσοστά συγκράτησης (<81%). Από την άλλη μεριά, η επίδραση της πόλωσης που παρατηρήθηκε για την υδρόφοβη PS είχε ως αποτέλεσμα την ανύψωση των ποσοστών συγκράτησης, για κάθε αύξηση της TMP και της συγκέντρωσης των β-γλυκανών. Βέβαια, είναι γενικά αποδεκτό ότι η πόλωση συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών στην επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει σε προσρόφηση των διαλυμένων ουσιών, κατακρήμνιση των διαλυμένων ουσιών και σε σχηματισμό στρώματος πολώσεως (Sablani et al., 2001), με αποτέλεσμα αυξημένα ποσοστά απόρριψης. Παρόλο που η PS παρουσίασε χαμηλότερες τιμές συγκράτησης σε σύγκριση με την RC, στην υψηλότερη τιμή TMP (3 bar) επέδειξε αρκετά ικανοποιητικά ποσοστά (75-90%). Συνοψίζοντας, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η PS επιλέχθηκε δικαιολογημένα ως η ιδανικότερη μεταξύ των άλλων (RC και PES) για την ανάκτηση των β-γλυκανών από το απόβλητο βρώμης, αφού παρουσίασε πολύ υψηλότερες τιμές FR σε σύγκριση με την RC. Ωστόσο, η μείωση της απόδοσής της (fouling effects) αναμενόταν να είναι μικρότερη λόγω της παρουσίας άλλων διαλυμένων συστατικών και μακρομορίων (Πίνακας 8.3.).

# 8.2.2. <u>Επεζεργασία των β-γλυκανών στο σύστημα υπερδιήθησης κάθετης ροής σε σύγκριση με το</u> σύστημα υπερδιήθησης εφαπτομενικής ροής

Η εφαρμογή της διεργασίας υπερδιήθησης στο κελί κάθετης ροής ήταν αρκετά περιορισμένη, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται από τις ληφθείσες τιμές της FR (έως 38%), για όλους τους τύπους μεμβρανών που εξετάστηκαν (Πίνακας 8.1.). Γι' αυτό το λόγο εφαρμόστηκε συγκριτικά και ένα σύστημα εφαπτομενικής ροής για την επιλεγμένη μεμβράνη PS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εφαρμογή της μονάδας εφαπτομενικής ροής αύξησε τις τιμές της FR για την

PS (72-79%), μόνο για τις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις (200-600 mg/L). Ωστόσο, το σύστημα εφαπτομενικής ροής είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερες τιμές πυκνότητας ροής και διαπερατότητας σε αυτές τις συγκεντρώσεις, για κάθε εφαρμοζόμενη τιμή TMP. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε τόσο για την πυκνότητα ροής όσο και για τη διαπερατότητα του νερού, γεγονός το οποίο αποδεικνύει την ισχυρή εξάρτηση από τα χαρακτηριστικά και τις προδιαγραφές κατασκευής των δύο μονάδων υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν. Στο κελί κάθετης ροής, η TMP οδηγεί το διάλυμα μετωπικής τροφοδοσίας (dead end) πάνω στην μεμβράνη χωρίς να το ανακυκλώνει, με αποτέλεσμα ο διαλύτης και τα διαλυμένα συστατικά να οδηγούνται κατευθείαν διαμέσου της επιφάνειας της μεμβράνης. Καθώς τα μόρια έρχονται πιο κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης, η πυκνότητα ροης και η διαπερατότητα μειώνονται ταχύτατα με το χρόνο, ενώ αυξάνεται η απόρριψη, και η απόδοση της μεμβράνης αρχίζει να υποβαθμίζεται (fouling) (Mulder, 1996). Στη μονάδα εφαπτομενικής ροής, επικρατεί η μέθοδος της εφαπτομενικής τροφοδοσίας (cross flow), δηλαδή το διάλυμα τροφοδοτείται παράλληλα στην επιφάνεια της μεμβράνης λόγω της ασκούμενης TMP υπό συνεχή ανακύκλωση. Ο διαλύτης και οι διαλυμένες ουσίες οδηγούνται πλαγίως διαμέσου της επιφάνειας της μεμβράνης και κάθετα προς το βασικό ρεύμα (Mota et al., 2002). Επομένως, το ρεύμα τροφοδοσίας εισέρχεται στο σύστημα της μεμβράνης έχοντας μία συγκεκριμένη σύσταση, η οποία στην πορεία μεταβάλλεται ως συνάρτηση της απόστασης (μέσα στη μονάδα υπερδιήθησης), γεγονός το οποίο συντελεί στον σχηματισμό πλακούντα (cake) περιορισμένου πάχους (Mulder, 1996). Σ' αυτή την περίπτωση, η ύφεση της πυκνότητας ροής είναι σχετικά πιο μικρή, η επίδραση του φαινομένου της πόλωσης συγκέντρωσης μειώνεται και ενισχύεται η επιλεκτικότητα. Δεδομένου ότι η υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης (fouling) έχει παρατηρηθεί κυρίως για το κελί κάθετης ροής, οι χαμηλότερες τιμές πυκνότητας ροής και διαπερατότητας που λήφθηκαν για το σύστημα εφαπτομενικής ροής θα μπορούσαν να συσχετιστούν με τη χαμηλή ταχύτητα ανακυκλοφορίας. Για παράδειγμα, αυξανομένης της ταχύτητας ανακυκλοφορίας παρατηρείται ανύψωση του ρυθμού διάτμησης και διάχυσης των διαλυμένων ουσιών, οι οποίες συσσωρεύονται στην επιφάνεια της μεμβράνης, προκαλώντας επιτάχυνση της πυκνότητας ροής του διηθήματος (Ahmad et al., 2005). Τα αποτελέσματα συγκράτησης επιβεβαίωσαν τις παραπάνω θεωρίες. Πιο συγκεκριμένα, οι αντίστοιχοι συντελεστές συγκράτησης αυξήθηκαν για όλες τις συγκεντρώσεις και τις τιμές TMP που μελετήθηκαν, αποδεικνύοντας αύξηση της επιλεκτικότητας. Η μονάδα εφαπτομενικής ροής παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές συγκράτησης (95%). Για την περίπτωση του περισσότερο συμπυκνωμένου πρότυπου διαλύματος (2000 mg/L) σε συνδυασμό με την υψηλότερη τιμή ασκούμενης TMP (3 bar), η επίδραση του φαινομένου πόλωσης συγκέντρωσης αναμενόταν να είναι μέγιστη. Επομένως, η μονάδα εφαπτομενικής ροής δεν είχε και τόσο καλή

απόδοση σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, το οποίο γίνεται εμφανές αν παρατηρήσουμε τα αντίστοιχα επίπεδα των τιμών FR, τα οποία παρέμεναν πολύ χαμηλά (Πίνακας 8.1.). Ωστόσο, οι τιμές πυκνότητας ροής και διαπερατότητας ήταν υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για το κελί κάθετης ροής, υποδηλώνοντας την υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης (fouling) στο κελί.

# 8.2.3. <u>Εφαρμογή της διεργασίας της υπερδιήθησης στις β-γλυκάνες που προέρχονταν από το</u> στερεό απόβλητο βρώμης

Τα διαλύματα τροφοδοσίας προετοιμάστηκαν από φρέσκο στερεό απόβλητο βρώμης, κατόπιν διαδοχικών εκχυλίσεων (με θέρμανση) σε βασικό περιβάλλον, με ταυτόχρονη απομάκρυνση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών και ρύθμιση του pH των προκύπτοντων διαλυμάτων σε όξινο. Η μεθοδολογία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών με την παράλληλη διαλυτοποίηση των β-γλυκανών. Τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης περιείχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες σε σχέση με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (Πίνακας 8.3.), ενώ στο αρχικό απόβλητο βρώμης τα ποσοστά των β-γλυκανών ήταν τρεις φορές χαμηλότερα (Πίνακας 6.1., Κεφ. 6). Ομοίως, το ποσοστό ανάκτησης των πρωτεϊνών ήταν χαμηλότερο του 3%, επιτυγχάνοντας αποτελεσματική απομάκρυνσή τους από το αρχικό απόβλητο. Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης ήταν αποτελεσματική στο να συμπυκνώσει τις περιεχόμενες β-γλυκάνες στα αρχικά διαλύματα τροφοδοσίας, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, το ποσοστό εκχύλισης των β-γλυκανών στο διάλυμα τροφοδοσίας ήταν αρκετά χαμηλό (8-10%). Ως εκ τούτου, το μεγαλύτερο τμήμα των διαλυτών β-γλυκανών ανακτήθηκε κατά τη αντίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης και βρίσκεται στο τελικό προϊόν, το γάλα βρώμης. Όμως, δεδομένου ότι το διάλυμα τροφοδοσίας που ανακτήθηκε από το απόβλητο βρώμης περιείχε συγκέντρωση σε β-γλυκάνες χαμηλότερη από 600 mg/L (Πίνακας 8.3.), η εφαρμογή της διεργασίας της υπερδιήθησης θα ήταν εφικτή για την ανάκτηση των β-γλυκανών.

Επομένως, η PS εφαρμόστηκε στη μονάδα εφαπτομενικής ροής αντικαθιστώντας τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης, με τα τρία διαλύματα τροφοδοσίας από το απόβλητο βρώμης (A, B και C). Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 8.4., οι πυκνότητες ροής του διηθήματος παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με τις αντίστοιχες τιμές ροής που λήφθηκαν για τα πρότυπα διαλύματα των 200 και 600 mg/L σε πίεση 1 bar, διαπιστώνοντας ότι η διεργασία της υπερδιήθησης πραγματοποιήθηκε φυσιολογικά. Από την άλλη μεριά, το γεγονός ότι οι ροές του διηθήματος αυξάνονταν ταχύτατα με κάθε αύξηση της TMP και με κάθε μείωση της περιεκτικότητας σε

διαλυμένες ουσίες (από το διάλυμα Α προς το C) αποδεικνύει μια δυνητική "διάρρηξη" της μεμβράνης, ειδικότερα στην πίεση των 3 bar. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε από τις τιμές της διαπερατότητας, οι οποίες αυξάνονταν αναλογικά με κάθε αύξηση της TMP, σε αντίθεση με την τάση που παρατηρήθηκε για τα πρότυπα διαλύματα (Πίνακας 8.1.). Οι ροές του διηθήματος ήταν αρκετά χαμηλές για το περισσότερο συμπυκνωμένο διάλυμα (A), ενώ οι τιμές της διαπερατότητας ήταν παρόμοιες για κάθε τιμή ασκούμενης πίεσης (TMP). Τα παραπάνω αποτελέσματα απέδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις σε διαλυμένες ουσίες και μακρομόρια (π.χ. β-γλυκάνες, πρωτεΐνες, άλλοι πολυσακχαρίτες) ανέστειλαν τη "διάρρηξη" της μεμβράνης, πιθανότατα γεμίζοντας κατά κάποιο τρόπο τους διευρυμένους πόρους της μεμβράνης. Ως βέλτιστη τιμή TMP για την υπερδιήθηση των β-γλυκανών από τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης επιλέχθηκε η μεσαία τιμή πίεσης (2 bar). Η επιλογή αυτή προέκυψε συγκρίνοντας τις τιμές διαπερατότητας μετα 3 bar, για τα δύο εκ των τριών διαλυμάτων τροφοδοσίας (A και B).

Η διαδικασία ανάκτησης των β-γλυκανών από το απόβλητο βρώμης δεν ήταν η ιδανική περίπτωση ανάκτησης όπως παρατηρήθηκε για τα πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης. Ωστόσο, οι τιμές συγκράτησης παρέμειναν σε ικανοποιητικά επίπεδα, ειδικότερα στην περίπτωση του περισσότερου συμπυκνωμένου διαλύματος (Α), όπου ανακτήθηκαν περίπου τα 2/3 των περιεχόμενων β-γλυκανών (~67%, Πίνακας 8.5.). Αυτό το αποτέλεσμα απέδειξε ότι οι ανακτηθείσες β-γλυκάνες κατείχαν MB χαμηλότερο σε σύγκριση με τις β-γλυκάνες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων (π.χ. <122 kDa). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η διαδικασία της εκχύλισης συντέλεσε στην περιορισμένη αποδόμηση των μακρομορίων των β-γλυκανών. Επιπλέον, η διεργασία της υπερδιήθησης μπορούσε να διαχωρίσει ικανοποιητικά τις β-γλυκάνες από μικρότερα σάκγαρα (π.χ. μαλτόζη, ολιγοσακγαρίτες) και κατιόντα (π.γ. κάλιο, νάτριο). Ωστόσο, ο αντίστοιγος διαγωρισμός για τις πρωτεΐνες δεν ήταν τόσο ευδιάκριτος. Πιο συγκεκριμένα, ένα τμήμα των πρωτεϊνών ανακτήθηκε μαζί με τις β-γλυκάνες (Πίνακας 8.5., τιμές συγκράτησης από 35-40%). Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι οι τιμές συγκράτησης για τις β-γλυκάνες ήταν άνω του 50% υψηλότερες σε σχέση με τους συντελεστές συγκράτησης για τις πρωτεΐνες, η υπερδιήθηση θα μπορούσε κάλλιστα να εφαρμοστεί για την αύξηση του ποσοστού των β-γλυκανών και την ελάττωση του ποσοστού των πρωτεϊνών στο ρεύμα του συμπυκνώματος. Παρομοίως, οι τιμές των συντελεστών συγκράτησης του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Πίνακας 8.5., <14%), υποδεικνύοντας ότι η διεργασία της υπερδιήθησης θα μπορούσε να διαχωρίσει β-γλυκάνες και μικρότερες οργανικές ενώσεις, όπως φαινόλες, οργανικά οξέα, κ.ά. Εν τέλει, η εκχύλιση άλλων οργανικών μορίων (εκτός των β-γλυκανών) από το απόβλητο βρώμης ήταν σχεδόν αμελητέα, καθότι τα ολικά σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένων ή όχι των β-γλυκανών, κατείχαν το ίδιο χαμηλές τιμές (Πίνακας 8.5., λιγότερο του 15% και 11%, αντίστοιχα). Πρόκειται για μία σημαντική διαπίστωση, διότι το ποσοστό των β-γλυκανών στο σύνολο των ολικών διαιτητικών ινών του αποβλήτου βρώμης ήταν κάτω του 25% (Πίνακας 6.1., Κεφ.6). Άλλωστε, οι χαμηλές τιμές συγκράτησης για το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Πίνακας 8.5., <14%) επιβεβαίωσαν αυτή τη θεώρηση.

### ΙΥ. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 - ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΜΕ ΤΗΝ α-ΑΜΥΛΑΣΗ

#### 9.1. Εισαγωγή

Ο επιτυχής σχεδιασμός της γραμμής παραγωγής σε μία βιομηχανία τροφίμων βασισμένης σε ενζυμικές διεργασίες, απορρέει από τη εφαρμογή ποικίλων μοντέλων πρόβλεψης. Τα "ακριβή" θεωρητικά μοντέλα είναι αρκετά πολύπλοκα και απαιτούν αρκετά δεδομένα, πόσο μάλλον περισσότερο όταν πρόκειται για πολυενζυμικά συστήματα. Όσον αφορά τα εμπειρικά μοντέλα, επίσης παρουσιάζουν δυσκολίες προκειμένου να λειτουργήσουν σωστά, συμπεριλαμβάνοντας πολλές παραμέτρους, αλλά η μεγαλύτερη δυσκολία σχετίζεται με τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε γενικές γραμμές, η εφαρμογή των μοντέλων, και έπειτα η ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων, ή και το αντίστροφο, δεν αποδίδει πάντα. Γι' αυτό το λόγο, προτείνεται ένα διαδραστικό σχήμα, μία πολυβάθμια συσχέτιση μεταξύ θεωρίας και πειράματος.

Προκειμένου να βελτιστοποιήσουμε τη γραμμή παραγωγής που ακολουθείται στη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης, αναπτύχθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο, βασισμένο σε αρχική ιδέα του κ. Γκέκα, στην εφαρμογή της τροποποιημένης μορφής της εξίσωσης Boltzmann. Ουσιαστικά, μελετήθηκε η συσχέτιση της πολλαπλότητας υδρολύσεων (multiplicity, w) με το μέγεθος (s) (ανά μονάδα μορίων γλυκόζης) του υποστρώματος, ως προς τα προϊόντα της υδρόλυσης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε με τη δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης. Η μαθηματική ανάλυση έδειξε ότι η σχέση αυτών των δύο παραμέτρων ήταν λογαριθμική, όπως ήταν αναμενόμενο. Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει την τυχαία δράση του ενδο-ενζύμου της α-αμυλάσης, ως προς τα τελικά, άλλα και ενδιάμεσα προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε πρόβλεψη της εμφάνισης ενός συγκεκριμένου προϊόντος, της μαλτόζης, και στη συνέχεια τα αποτελέσματα του μοντέλου συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα της ενζυμικής υδρόλυσης. Στη συνέχεια του κεφαλαίου παρουσιάζεται αναλυτικά η ανάπτυξη του μοντέλου προσομοίωσης.

### 9.2. Μοντέλο προσομοίωσης του μηχανισμού ενζυμικής υδρόλυσης της αμυλόζης και του αμύλου

Το μοντέλο αφορά, σε πρώτη φάση, τη δράση της α-αμυλάσης κατά την πλήρη υδρόλυση ευθείας αλυσίδας μορίων (αμυλόζης). Στόχος είναι η πρόβλεψη της πιθανότητας εμφάνισης της μαλτόζης στην τελική φάση της υδρόλυσης. Επιχειρείται η συσχέτιση των πιθανών συνδυασμών

των τελικών (αλλά και ενδιάμεσων) προϊόντων υδρόλυσης με την πιθανότητα εμφάνισης της μαλτόζης ως τελικό προϊόν. Επιπλέον, πραγματοποιείται αναγωγή της περίπτωσης του ευθύγραμμου μορίου της αμυλόζης στην πιο περίπλοκη περίπτωση του πολυσύνθετου μορίου του αμύλου. Τέλος, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων του μοντέλου, με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.

Στη προσπάθειά μας να μοντελοποιήσουμε τη δράση της α-αμυλάσης ως προς την πλήρη υδρόλυση της αμυλόζης, παρατηρήσαμε ότι, ενώ θεωρητικά το ενδο-ένζυμο δρα με τυχαίο μηχανισμό, εντοπίστηκε ένας συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης, ο οποίος εμφανίζει μια σταθερή απόκλιση από μία απολύτως συμμετρική συμπεριφορά, η οποία και περιγράφεται παρακάτω. Αυτή η παρατήρηση μας οδήγησε αρχικά στο να προσδιορίσουμε πλήρως το "συμμετρικό μοντέλο" και στη συνέχεια να το αναγάγουμε στο "πραγματικό μοντέλο". Προκειμένου να γίνουν σαφείς οι έννοιες "συμμετρικό" και "πραγματικό μοντέλο", δίδονται οι ορισμοί τους:

- "Συμμετρικό μοντέλο": Μοντέλο το οποίο αναπαριστά έναν καθοδηγούμενο, οργανωμένο, μη-τυχαίο και μη-πραγματικό μηχανισμό δράσης της α-αμυλάσης ως προς την πλήρη υδρόλυση της αμυλόζης. Η ιδιαιτερότητα αυτού του μοντέλου, είναι η ύπαρξη συμμετρίας της ευθύγραμμης αλυσίδας κατά την υδρόλυσή της από το ενδο-ένζυμο, πράγμα το οποίο δεν υφίσταται στην πραγματικότητα.
- "Πραγματικό μοντέλο": Μοντέλο το οποίο ανταποκρίνεται σε λογικές παραδοχές, θεωρώντας ότι δεν υπάρχει συμμετρία, και το οποίο προκύπτει από το "συμμετρικό μοντέλο" με κάποιες τροποποιήσεις, οι οποίες θα αναφερθούν εκτενέστερα παρακάτω.
   Θεωρητικά το "πραγματικό μοντέλο" μπορεί να προβλέψει το μηχανισμό δράσης της ααμυλάσης ως προς την πλήρη υδρόλυση μιας ευθείας αλυσίδας, και επακολούθως του πολυσύνθετου μορίου του αμύλου με κάποιες τροποποιήσεις.

Αξίζει να αναφερθεί ότι για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου βασιστήκαμε σε μια δημοσιευμένη εργασία των Wojciechowski P.M. et al (2001), στην οποία παρουσιάστηκε ένα μοντέλο το οποίο προσομοιάζει την υδρόλυση του αμύλου από αμυλολυτικά ένζυμα, βασισμένο στη μέθοδο του Monte Carlo.

#### 9.3. Παραδοχές για το "συμμετρικό μοντέλο"

Αρχικά θα πρέπει να γίνει αναφορά στις παραδοχές που γίνανε προκειμένου να αναπτυχθεί το "συμμετρικό μοντέλο":

- Εξετάζουμε ευθύγραμμους ολιγοσακχαρίτες, ξεκινώντας από 5-μερή (ευθύγραμμη αλυσίδα που περιέχει πέντε μόρια γλυκόζης). Η α-αμυλάση δεν μπορεί να "κόψει" μόριο μικρότερο από το 5-μερές και επίσης, θεωρούμε ότι το μέγιστο μήκος της αλυσίδας ισοδυναμεί με εκείνο της αμυλόζης.
- 2) Η α-αμυλάση "κόβει" τις αλυσίδες γλυκόζης με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκλείει τους ακραίους δεσμούς (δεσμούς γειτονικούς στα αναγωγικό και μη-αναγωγικό άκρο μιας ευθείας αλυσίδας). Συγκεκριμένα, σε ένα 10-μερές (ευθύγραμμη αλυσίδα που περιέχει δέκα μόρια γλυκόζης), η α-αμυλάση δεν έχει καμία πιθανότητα να "κόψει" το μόριο στις θέσεις 1 και 9 [κάθε θέση αναπαριστά έναν γλυκοζιτικό δεσμό α(1→4), και η αρίθμηση των δεσμών ξεκινά από το ένα άκρο της αλυσίδας μονάδων γλυκόζης].
- 3) Ο μεσαίος δεσμός σε ένα n-μερές, όπου το n είναι άρτιος αριθμός, (π.χ. στο 10-μερές ο δεσμός στο 5) λαμβάνεται υπόψη μόνο μία φορά στο "συμμετρικό μοντέλο" με άλλα λόγια έχει την πιθανότητα να υδρολυθεί μόνο μία φορά στο "συμμετρικό μοντέλο" (διευκρίνιση που δίνεται λόγω συμμετρίας). Στην περίπτωση όπου το n είναι περιττός αριθμός, δεν τίθεται τέτοιο θέμα.
- 4) Με βάση την προηγούμενη παραδοχή, το ίδιο θα ισχύει και για μεγαλύτερα n-μερή (όπου το n είναι άρτιος αριθμός). Συγκεκριμένα, στο 12-μερές, που ενδεχομένως μπορεί να δώσει ως προϊόντα, ένα 7-μερές και ένα 5-μερές (7+5) στην πρώτη φάση της υδρόλυσης, στη δεύτερη φάση της υδρόλυσης ενδεχομένως να δώσει τον εξής συνδυασμό προϊόντων: 7+5 → 5+2+5. Όμοια με την προηγούμενη παραδοχή, το 5-μερές και σ' αυτή την περίπτωση λαμβάνεται υπόψη μόνο μία φορά στο "συμμετρικό μοντέλο" (διευκρίνιση που δίνεται λόγω συμμετρίας).
- 5) Σε μεγάλες ευθείες αλυσίδες γλυκόζης (n>10), μετά την πρώτη φάση της ενζυμικής υδρόλυσης (πρώτο "κόψιμο" της α-αμυλάσης), ενδεχομένως και τα δύο προϊόντα να μπορούν να υδρολυθούν περαιτέρω (n≥5). Σε αυτή την περίπτωση, θεωρούμε ότι μπορεί να υδρολυθεί είτε το ένα είτε το άλλο προϊόν αντίστοιχα, με ίσες πιθανότητες. Π.χ. σε ένα 13-μερές, η α-αμυλάση θα μπορούσε να "κόψει" στη θέση 7-6. Στην περίπτωση αυτή, στη δεύτερη φάση της υδρόλυσης είναι ισοπίθανη η υδρόλυση τόσο του 7-μερούς όσο και του 6-μερούς.

Όσον αφορά το "πραγματικό μοντέλο", υπάρχει μία μικρή διαφοροποίηση στις προαναφερθείσες παραδοχές. Συγκεκριμένα, ισχύουν οι παραδοχές 1, 3, 4 και 5, αλλά όχι η

2. Όπως αναφέρουν και οι Wojciechowski et al (2001), η α-αμυλάση μπορεί να "κόψει" σε απόσταση μέχρι και 2 μονομερή από το αναγωγικό άκρο και 3 μονομερή από το μηαναγωγικό άκρο αντίστοιχα. Δηλαδή η α-αμυλάση "κόβει" με τρόπο που αποκλείει τις ακραίες συμμετρικές θέσεις, γι' αυτό και δεν υπάρχει συμμετρία στον μηχανισμό δράσης της. Χαρακτηριστικά παραθέτουμε την πλήρη υδρόλυση μιας 10-μερούς ευθύγραμμης αλυσίδας (Σχήμα 9.1):



Σχήμα 9.1. Σχηματική αναπαράσταση της πλήρους υδρόλυσης ενός 10-μερούς ευθύγραμμου μορίου.

Το παραπάνω σχήμα προκύπτει από τον νόμο των πιθανοτήτων, παρουσιάζοντας όλους τους δυνατούς συνδυασμούς προϊόντων (τελικών και ενδιάμεσων) κατά την πλήρη υδρόλυση ενός 10-μερούς από το ένζυμο της α-αμυλάσης. Οι συνδυασμοί των προϊόντων στα λευκά κουτάκια εκπροσωπούν το "πραγματικό μοντέλο", ενώ τα λευκά μαζί με τα γκρίζα κουτάκια είναι οι υποτιθέμενοι συνδυασμοί λόγω συμμετρίας ("συμμετρικό μοντέλο"). Και στις δύο περιπτώσεις λαμβάνονται υπόψη οι αντίστοιχες παραδοχές που προαναφέρθηκαν.

#### 9.4. Ανάπτυζη του μοντέλου

Προκειμένου να αναπτυχθεί ένα μοντέλο, ικανό να προσομοιάζει τον μηχανισμό δράσης της ααμυλάσης, εξετάστηκαν αρκετές περιπτώσεις υδρόλυσης όμοιας με του 10-μερούς (Σχήμα 9.1.). Μόνο κατ' αυτόν τρόπο θα μπορούσε να δημιουργηθεί μια σαφής εικόνα για τη κατανομή των προϊόντων στις διάφορες φάσεις της υδρόλυσης (multiplicity, w), δεδομένου ότι η πιθανότητα εμφάνισης της μαλτόζης ως τελικό προϊόν συνδέεται άμεσα με την πολλαπλότητα των υδρολύσεων (w), κυρίως κατά την τελευταία φάση της υδρόλυσης. Συνεπώς, τέθηκαν οι παρακάτω στόχοι:

- Να δημιουργηθεί μία σχέση που να συνδέει την πολλαπλότητα των υδρολύσεων (w) με το μέγεθος του μορίου (s), για το "συμμετρικό μοντέλο".
- Να δημιουργηθεί μια σχέση που να συνδέει την πολλαπλότητα των υδρολύσεων (w) με την P(maltose) στο "συμμετρικό μοντέλο", όπου ως P(maltose), ορίζεται η πιθανότητα εμφάνισης μαλτόζης στα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης.
- 3. Να δημιουργηθεί μία σχέση που να συνδέει το w του "συμμετρικού μοντέλου", με το w του "πραγματικού μοντέλου". Η σχέση αυτή θα μπορούσε να επαληθεύσει το γεγονός ότι το "συμμετρικό μοντέλο" διαφοροποιείται από το "πραγματικό μοντέλο", κατά μία σταθερή απόκλιση.
- 4. Να δημιουργηθεί μία σχέση που να συνδέει την P(maltose) του "συμμετρικού μοντέλου", με την P(maltose) του "πραγματικού μοντέλου", η οποία σχέση οριοθετεί και τον τελικό μας στόχο· να μπορούμε να εκτιμήσουμε την πιθανότητα εμφάνισης της μαλτόζης στα τελικά προϊόντα, έχοντας ως μόνο δεδομένο το μέγεθος του μορίου που υδρολύεται.

Κατ' αυτόν τον τρόπο, έγινε αναγωγή του προβλήματος σε ένα μαθηματικό πρόβλημα συνδυαστικής, προκειμένου να προσδιοριστεί πλήρως η συμπεριφορά του "συμμετρικού μοντέλου".

#### 9.5. Συμβολισμοί

Αρχικά, ορίζουμε ως s, το μέγεθος του μορίου (ως προς τις μονάδες γλυκόζης που περιέχει), και ως w την πολλαπλότητα των υδρολύσεων (multiplicity), και πιο συγκεκριμένα w<sub>1</sub> για την πρώτη φάση της υδρόλυσης, w<sub>2</sub> για τη δεύτερη φάση της υδρόλυσης, κ.ο.κ.

Οι πιθανοί συνδυασμοί των παραγόμενων προϊόντων στο σχήμα 9.1. εμφανίζονται με τη μορφή αθροίσματος αριθμών. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους:

- Διότι, κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται "μαθηματική" κατανόηση του προβλήματος, απομονώνοντάς το από το βιολογικό του χαρακτήρα άμεσα, οπότε δύναται να αντιμετωπιστεί πλέον ως θέμα συνδυαστικής.
- 2. Ο δεύτερος και πιο σημαντικός λόγος, έγκειται στο γεγονός ότι η δράση της α-αμυλάσης μπορεί να αντιμετωπιστεί άμεσα σαν μια γενέτειρα μη-τυχαίων αριθμών. Θεωρούμε ότι κάθε *n*-μερές είναι μια διάταξη μη-τυχαίων αριθμών, οι οποίοι, κατόπιν λογικής επεξεργασίας, ανασυνδυάζονται με μη-τυχαίο τρόπο. Συγκεκριμένα, η δράση της α-αμυλάσης ως προς ένα 10-μερές περιγράφεται με τα παρακάτω βήματα, ως εξής:
  - i. Το μόριο "λαμβάνει" μια σειρά αριθμών, από 2 έως 8.
  - ii. "Λαμβάνει" έναν-έναν τους όρους της σειράς και τους αφαιρεί από το μέγεθος
    του μορίου (στην προκειμένη περίπτωση από το 10), ώστε να προκύψει μια
    νέα σειρά (φθίνουσα αυτή τη φορά), από 8 ως 2.
  - iii. Ανασυνδυάζει τους όρους των δύο αυτών σειρών, έναν προς έναν, ώστε να προκύψουν οι συνδυασμοί της πρώτης φάσης της υδρόλυσης (2+8), (3+7), (4+6),....,(8+2).

Το τελευταίο βήμα αποτελεί μια πολύ χρήσιμη πληροφορία, ειδικά όταν επρόκειτο για τη δημιουργία ενός προγράμματος που θα υπολογίζει τόσο τον αριθμό των πιθανών συνδυασμών (w), όσο και το ποιοι είναι αυτοί.

Ωστόσο, για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού, δεδομένου ότι πρέπει να γίνει και η αναγωγή στο "πραγματικό μοντέλο", είναι αναγκαία και η ανάλυση χρησιμοποιώντας λογικά βήματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι για σχετικά μικρά μόρια (π.χ για *n*-μερή, όπου *n*<10), είναι σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός του *w*, καθώς και η πιθανότητα εμφάνισης της μαλτόζης στα τελικά προϊόντα. Συνεπώς, εστιάζουμε κυρίως σε μόρια αρκετά μεγάλα, τα οποία είναι και περισσότερο πολύπλοκα.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η διαδικασία με την οποία προσδιορίστηκαν τα  $w_1$ ,  $w_2$ ,  $w_3$ ,... $w_n$ , για το "συμμετρικό" μοντέλο.

#### ο <u>Προσδιορισμός του *w*<sub>1</sub> ("συμμετρικό μοντέλο")</u>

Πρόκειται για τον προσδιορισμό των πιθανών συνδυασμών προϊόντων που θα προκύπτουν μετά την πρώτη φάση της υδρόλυσης. Το  $w_I$  θα ισοδυναμεί (αριθμητικά) με s-3 (όπου s, άρτιος αριθμός), λόγω των παραδοχών 2 και 3 (Παράγραφος 9.3.). Συγκεκριμένα, η διαφορά s-3 προκύπτει από την παραδοχή 2, αφού δεν μπορούν να υδρολυθούν οι 2 ακραίοι δεσμοί (π.χ., στην περίπτωση ενός 10-μερούς, οι δεσμοί 1-2 και 9-10), καθώς και από την παραδοχή 3, σύμφωνα με την οποία σε ένα n-μερές (όπου n, άρτιος αριθμός), ο μεσαίος δεσμός λαμβάνεται υπόψη μόνο μία φορά (ή έχει τη δυνατότητα να υδρολυθεί μόνο μία φορά). Άρα:

$$w_1 = s - 3$$

#### <u>Προσδιορισμός του w<sub>2</sub> ("συμμετρικό μοντέλο"</u>)

Για τον προσδιορισμό του w<sub>2</sub>, ισχύει η διαδικασία που ακολουθεί. Στην περίπτωση ενός υποστρώματος ενός 10-μερούς, μετά την πρώτη φάση της υδρόλυσης (w<sub>1</sub>) θα προκύπτει ο παρακάτω συνδυασμός προϊόντων:

8+2	
7+3	
6+4	
5+5	
4+6	
3+7	
2+8	

Όπως είναι φανερό, το w<sub>2</sub> του 10-μερούς θα ισούται με το άθροισμα των:

 $w_{1(8)} + w_{1(7)} + w_{1(6)} + w_{1(5)} + w_{1(6)} + w_{1(7)} + w_{1(8)},$ 

το οποίο άθροισμα μπορεί να γραφτεί και ως εξής:

 $2 * (w_{1(8)} + w_{1(7)} + w_{1(6)} + w_{1(5)}) - w_{1(5)}$ 

Υδρολύονται δηλαδή όλα εκείνα τα n-μερή για τα οποία  $n \ge 5$ .

Παρατηρούμε ότι το άθροισμα έχει αυτή τη μορφή επειδή το 10 είναι άρτιος αριθμός, διαφορετικά δε θα χρειαζόταν να αφαιρεθεί το  $w_{1(5)}$  ωστε να ισχύει η παραδοχή 3. Αν το *s* είναι περιττός αριθμός, τότε η μεσαία περίπτωση υπολογίζεται ούτως ή άλλως μία φορά. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ενός 9-μερούς, οι δεσμοί που δεν μπορούν να υδρολυθούν είναι οι 1-2 και 8-9, ενώ δεν μας απασχολεί η παραδοχή 3. Με βάση τα παραπάνω, είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι το μεγαλύτερο μόριο που θα εμφανίζεται μετά την πρώτη υδρόλυση θα είναι το μόριο μεγέθους *s*-2.

Κατ' αυτόν τον τρόπο καταλήξαμε στους 2 παρακάτω τύπους, για τη δεύτερη φάση της υδρόλυσης, οι οποίοι ισχύουν ακόμη και για τα αρκετά μεγάλα μόρια ( $s \ge 10$ ).

Αν s άρτιος:

$$W_2 = 2 \sum_{k=s}^{k=s-2} wl(k) - wl(\frac{s}{2})$$

Αν s περιττός:

$$W_2 = 2\sum_{k=s}^{k=s-2} w \mathbf{l}(k)$$

ο <u>Προσδιορισμός του w<sub>3</sub>...w<sub>n</sub> ("συμμετρικό μοντέλο")</u>

Ήδη έχοντας τη δυνατότητα να υπολογίσουμε το w<sub>2</sub> για αρκετά μεγάλα μόρια, έχει δημιουργηθεί μια καλή εικόνα για το πώς επιδρά το w κάθε προηγούμενης φάσης υδρόλυσης, στην επόμενη φάση. Προκειμένου όμως να υπολογιστεί το w μεγαλύτερης τάξης υδρολύσεων, παρατίθενται οι παρακάτω συλλογισμοί:

Ας υποθέσουμε ότι το υπόστρωμά μας είναι ένα αρκετά μεγάλο και χαρακτηριστικό μόριο, π.χ. το 13-μερές. Στην πρώτη φάση της υδρόλυσης θα παίρναμε τους παρακάτω συνδυασμούς προϊόντων:

11+2
10 + 3
9+4
8+5
7+6
6+7
5+8
4+9
3+10
2+11

Σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι στην τρίτη φάση της υδρόλυσης συμμετέχουν ακέραια τα  $w_{2(11)}$ ,  $w_{2(10)}$ , και  $w_{2(9)}$  (χωρίς να υπάρχει μαζί τους κάποιο άλλο μόριο/αλυσίδα που θα μπορούσε να υδρολυθεί). Το πρόβλημα εμφανίζεται όταν έχουμε να υπολογίσουμε ένα άθροισμα όπως το 8+5 όπου πρέπει να υπολογιστεί η πιθανότητα να διασπαστεί τόσο το 8-μερές όσο και το 5-μερές. Αντίστοιχα, το ίδιο ισχύει για τους συνδυασμούς 7+6, 6+7 και 5+8. Κάναμε λοιπόν την εξής παρατήρηση:

Για το συνδυασμό π.χ. 8+5 στη δεύτερη φάση της υδρόλυσης του 13-μερούς, θα προκύπτουν για το 8-μερές  $\rightarrow w_{1(8)}$  συνδυασμοί, και για το 5-μερές  $\rightarrow w_{1(5)}$  συνδυασμοί. Ωστόσο, οι  $w_{1(8)}$  συνδυασμοί περιέχουν ο καθένας τους το 5-μερές που δεν διασπάστηκε (αντίστοιχα και οι  $w_{1(5)}$  συνδυασμοί θα περιέχουν το 8-μερές). Συνεπώς, στην τρίτη φάση της υδρόλυσης ( $w_3$ ) προκύπτουν:

 $w_{1(8)}^* w_{1(5)}$  συνδυασμοί από το 8-μερές, και  $w_{1(5)}^* w_{1(8)}$  συνδυασμοί από το 5-μερές. Άρα συνολικά προκύπτουν: 2\*  $w_{1(5)}^* w_{1(8)}$  συνδυασμοί.

Ωστόσο, δεν έχουν καταμετρηθεί όλα τα προκύπτοντα αθροίσματα προϊόντων κατά τη δεύτερη φάση της υδρόλυσης, όπου ενδέχεται να διασπαστούν δύο (ή πάνω από δύο όροι σε μεγαλύτερα μόρια) ολιγομερή. Στην προκειμένη περίπτωση θα πρέπει να υπολογιστεί το  $w_{1(6)}$  για το συνδυασμό (6+2)+5, ο οποίος προκύπτει μάλιστα 2 φορές. Η διάσπαση του 5-μερούς σε αυτόν το συνδυασμό έχει ήδη υπολογιστεί από το γινόμενο  $w_{1(5)}$ \* $w_{1(8)}$ , καθώς και η περαιτέρω διάσπαση του συνδυασμού 5+3+5 (λόγω της παραδοχής 4). Με άλλα λόγια, είμαστε υποχρεωμένοι να συμπεριλαμβάνουμε πάντα τη διάσπαση των *n*-μερών για τα οποία ισχύει  $n \ge 5$ , και τα οποία δεν εμφανίζονται 2 φορές στον ίδιο συνδυασμό. Με αυτούς τους συλλογισμούς το  $w_{3(13)}$  θα ισούται με:

$$W_{3(13)}=2 * [w_{2(11)}+w_{2(10)}+w_{2(9)}+2*w_{1(5)}*w_{1(8)}+2w_{1(6)}*w_{1(7)}+2*w_{1(6)}+2*w_{1(5)}]$$

Στη συνέχεια παρατίθεται σχηματικά η διάσπαση ενός "πολύπλοκου συνδυασμού" (τμήμα της υδρόλυσης του 13-μερούς), έως και την τρίτη φάση της υδρόλυσης (Σχήμα 9.2.).



Σχήμα 9.2. Σχηματική αναπαράσταση δύο φάσεων της υδρόλυσης του 13-μερούς.

Στο παραπάνω σχήμα, τα λευκά κουτάκια εκπροσωπούν τους πιθανούς συνδυασμούς προϊόντων στο "πραγματικό μοντέλο", ενώ τα λευκά μαζί με τα γκρίζα τους συνδυασμούς στο "συμμετρικό μοντέλο". Με τον ίδιο τρόπο αναπτύσσεται το μοντέλο και για διαδοχικές υδρολύσεις μεγαλύτερων *n*-μερών. Οπότε, σε αυτό το σημείο, είμαστε σε θέση να προχωρήσουμε σε μια ακριβή μαθηματική περιγραφή του προβλήματος. Η μόνη δυσκολία που αντιμετωπίστηκε σε αυτό το στάδιο είναι οι συνεχώς αυξανόμενες αριθμητικές πράξεις για τον υπολογισμό του *w*.

111

#### 9.6. Προσέγγιση Boltzmann

Έχοντας προσδιορίσει πλήρως την κίνηση του μοντέλου σε επίπεδο απλής συνδυαστικής, ακολουθεί η αποτύπωσή του μέσω της εξίσωσης Boltzmann. Η εξίσωση αυτή θα μας οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση του προβλήματος, καθώς και σε πιο πρακτικά συμπεράσματα. Η εξίσωση Boltzmann περιγράφει στη θερμοδυναμική τις πιθανές μικροκαταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρεθεί ένα σύστημα. Το πρόβλημα που περιγράφεται εδώ, στη "συμμετρική" του μορφή υπάγεται στην περίπτωση Boltzmann, καθώς εξετάζονται, μακροσκοπικά πλέον, οι πιθανές καταστάσεις ενός μορίου όταν διασπαστεί από ένα ένζυμο. Οπότε αναμένεται μία λογαριθμική συμπεριφορά μεταξύ του *s*, το οποίο στην παρούσα περίπτωση παίρνει τη θέση της εντροπίας δεδομένου ότι όσο αυξάνεται τόσο πιο χαοτικό γίνεται το σύστημα, και του *w*, το οποίο αναπαριστά τον αριθμό υδρολύσεων του συστήματος. Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 9.3.α-δ), αντιπαραβάλλεται το *w* της κάθε υδρόλυσης με το αντίστοιχο *s*, ως εξής:



Σχήμα 9.3. Συσχέτιση του lnw κάθε φάσης υδρόλυσης (a) w1, (β) w2, (γ) w3, (δ) w4, με το αντίστοιχο s.

Όπως είναι εμφανές από το Σχήμα 9.3., η σχέση μεταξύ του s και του w είναι καθαρά λογαριθμική, και προκύπτουν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- Στην εξίσωση κάθε καμπύλης υπάρχει πάντα ένας αριθμός που προστίθεται κάθε φορά, δεδομένου ότι τα διαγράμματα δεν περνούν από την αρχή των αξόνων. Αυτή η παρατήρηση δικαιολογείται από το γεγονός ότι δεν εξετάσαμε *n*-μερή με *n*<5.</li>
- Καθώς ο συντελεστής του λογαρίθμου μειώνεται, ο αριθμός που προστίθεται κάθε φορά αυξάνεται, γεγονός το οποίο εντείνεται με κάθε αύξηση της τάξης της υδρόλυσης. Η παραπάνω παρατήρηση είναι απολύτως λογική δεδομένου ότι όσο μεγαλύτερα περιθώρια έχει για να αναπτυχθεί το μόριο (ως προς το εύρος υδρολύσεων και συνδυασμών προϊόντων), τόσο πιο απόλυτα προσεγγίζει τη λογαριθμική συμπεριφορά. Στην εφαρμογή της εξίσωσης Boltzmann, αναμένουμε τον συντελεστή του λογαρίθμου να τείνει στο 1, και τον προσθετέο αριθμό να τείνει στο 5.

#### 9.7. Γραμμικοποίηση

Γραμμικοποιώντας την περίπτωση μίας αρκετά μεγάλης τάξης υδρόλυσης, τέτοιας ώστε να έχει αναπτυχθεί επαρκώς το μοντέλο, καταλήξαμε στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 9.4.) και στην αντίστοιχη εξίσωση:



Σχήμα 9.4. Γραμμικοποιημένο διάγραμμα μεγέθους-πολλαπλότητας υδρολύσεων για το "συμμετρικό" μοντέλο

Η εξίσωση της καμπύλης (Σχήμα 9.4.) έχει ως εξής:

#### Y=1,378 \* X +4,510

όπου:

 $\mathbf{Y} =$  νεπέριος λογάριθμος του μεγέθους του μορίου (s), και

 $\mathbf{X} =$ ο νεπέριος λογάριθμος του w.

Οι συντελεστές της παραπάνω εξίσωσης αναμένεται να μεταβληθούν ελάχιστα σε περίπτωση αύξησης τόσο του *s* όσο και του αριθμού των υδρολύσεων (*w*), καθώς σε αυτό το στάδιο υδρόλυσης έχουμε μια ικανοποιητική εικόνα ανάπτυξης του μοντέλου.

#### 9.8. Συσχέτιση "συμμετρικού" και "πραγματικού" μοντέλου

Εφόσον πραγματοποιήθηκε η πλήρης περιγραφή της απολύτως "συμμετρικής" περίπτωσης, είμαστε πλέον σε θέση να συσχετίσουμε το "συμμετρικό" με το "πραγματικό" μοντέλο. Στη συνέχεια παρουσιάζονται δύο πίνακες μετρήσεων (Πίνακας 9.1. & Πίνακας 9.2.), τόσο για το "συμμετρικό" όσο και για το "πραγματικό" μοντέλο (w στα διάφορα στάδια της υδρόλυσης των n-μερών για 5≤n≤14). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χωρίς την εφαρμογή κάποιου προγράμματος (με το χέρι), προκειμένου να επαληθεύσουμε και τις εκτιμήσεις μας.

Μέγεθος μορίου, (s)	<i>w</i> <sub>1</sub>	<i>w</i> <sub>2</sub>	<i>W</i> <sub>3</sub>	<i>W</i> 4	W5
5	2	2	2	2	2
6	3	3	3	3	3
7	4	6	6	6	6
8	5	11	11	11	11
9	6	18	22	22	22
10	7	26	44	44	44
11	8	40	94	102	102
12	9	51	151	211	211
13	10	70	276	528	544
14	11	84	398	978	1178

Πίνακας 9.1. Πολλαπλότητα υδρολύσεων (w) των *n*-μερών (για 5≤*n*≤14) για τα διάφορα στάδια της υδρόλυσης, στην περίπτωση του "συμμετρικού μοντέλου".

µ01101000.					
Μέγεθος μορίου, (s)	<i>w</i> <sub>1</sub>	<i>w</i> <sub>2</sub>	<i>W</i> 3	W4	W5
5	1	1	1	1	1
6	2	2	2	2	2
7	3	3	3	3	3
8	4	5	5	5	5
9	5	9	9	9	9
10	6	16	17	17	17
11	7	25	33	33	33
12	8	34	62	63	63
13	9	49	125	141	141
14	10	61	200	279	280

Πίνακας 9.2. Πολλαπλότητα υδρολύσεων (w) των *n*-μερών (για 5≤*n*≤14) για τα διάφορα στάδια της υδρόλυσης, στην περίπτωση του "πραγματικού μοντέλου".

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία πρώτη απόπειρα συσχέτισης του "συμμετρικού" με το "πραγματικό" μοντέλο, σε επίπεδο αριθμού υδρόλυσεων. Αντιπαραβάλαμε δηλαδή τα: w1("συμμετρικού μοντέλου") με w1("πραγματικού μοντέλου"), w2("συμμετρικού μοντέλου") με w2("πραγματικού μοντέλου"), κ.ο.κ., με αποτέλεσμα να προκύψει το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 9.5.):



**Σχήμα 9.5.** Συσχέτιση του "συμμετρικού" με το "πραγματικό" μοντέλο, σε επίπεδο αριθμού υδρολύσεων (multiplicity, w).

Αμέσως γίνεται αντιληπτό ότι το "συμμετρικό" και το "πραγματικό" μοντέλο συγκλίνουν. Από έναν αριθμό υδρολύσεων και μετά, τα δύο μοντέλα προβλέπουν την ύπαρξη ίδιου αριθμού προϊόντων. Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα, είναι ξεκάθαρο πλέον ότι μπορούμε να μεταβούμε από το "συμμετρικό μοντέλο" στο "πραγματικό μοντέλο" με έναν συγκεκριμένο τρόπο, δεδομένου μάλιστα ότι για μεγάλο αριθμό υδρολύσεων (w), τα μοντέλα συγκλίνουν (ή έχουν σχετικά σταθερά μεταβαλλόμενη απόκλιση).

Στη συνέχεια, ανατρέχοντας στις παρατηρήσεις για το "συμμετρικό" μοντέλο ανάπτυξης (παρ. 9.6.) επιχειρήσαμε μία τελική επεξεργασία μιας μεγάλης τάξης υδρόλυσης για να διαπιστώσουμε εάν έχουμε βρει κάποια πρότυπη συμπεριφορά, ανεξάρτητη συμμετρίας. Οπότε, αντιπαραβάλοντας τον λογάριθμο των  $w_5$  με το λογάριθμο του s, για το "πραγματικό" μοντέλο αυτή τη φορά, καταλήξαμε στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 9.6.), και από την καμπύλη προέκυψε η παρακάτω εξίσωση:

#### Y=1,608 \* X+5,213

όπου:

Y = το μέγεθος του μορίου (s), και

X = ο νεπέριος λογάριθμος του multiplicity (w).



Σχήμα 9.6. Γραμμικοποιημένη σχέση μεγέθους-πολλαπλότητητας για το "πραγματικό" μοντέλο

Η συμπεριφορά του "πραγματικού μοντέλου" είναι ακριβώς ίδια με εκείνη του "συμμετρικού", ωστόσο υπάρχει μια σταθερή απόκλιση, όπως είχε προβλεφθεί. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο μοντέλων εντοπίζεται στην κλίση της ευθείας, η οποία είναι της τάξης του 0,3. Κατ' αυτό τον τρόπο αποδεικνύεται και η ισχύς της προσέγγισης Boltzmann. Ο λόγος για τον οποίο δεν μπορούσε να εφαρμοστεί απευθείας η εξίσωση, είναι η μη-ύπαρξη συμμετρίας στο "πραγματικό μοντέλο". Ωστόσο, αποδεικνύοντας την ύπαρξη αυτής της σταθερής απόκλισης μέσω του "συμμετρικού μοντέλου", καταφέραμε επιτυχώς να επεκτείνουμε το εύρος εφαρμογών της εξίσωσης Boltzmann.

#### 9.9. Προσδιορισμός μαλτόζης

Έως τώρα επιτεύχθηκε η λεπτομερής ανάλυση της σχέσης που συνδέει το *s* με το *w*. Επόμενο βήμα είναι να διευκρινιστεί με ποιο τρόπο συνδέεται η σχέση αυτή με το ποσοστό εμφάνισης της μαλτόζης στα τελικά προϊόντα. Αρχικά, μία πιθανή υπόθεση/πρόβλεψη είναι ότι το ποσοστό της παραγόμενης μαλτόζης για το "συμμετρικό μοντέλο" μπορεί να πλησιάζει αρκετά το αντίστοιχο ποσοστό για το "πραγματικό μοντέλο". Εκτελώντας τους σχετικούς υπολογισμούς, προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα (Πίνακας 9.3.):

6	'Συμμετρικό" μοντέ	λο	"Πραγματικό" μοντέλο			
Μέγεθος, (s)	Μαλτόζη/σύνολο προϊόντων	Ποσοστό Μαλτόζης	Μέγεθος, (s)	Μαλτόζη/σύνολο προϊόντων	Ποσοστό Μαλτόζης	
5	2/4	50%	5	1/2	50%	
6	2/6	33%	6	1/2	50%	
7	8/16	50%	7	6/9	67%	
8	14/32	47%	8	9/18	50%	
9	36/74	49%	9	27/46	52%	
10	77/164	47%	10	57/111	51%	
11	210/458	46%	11	156/291	54%	
12	469/954	49%	12	371/683	54%	
13	1453/2654	55%	13	1098/2097	52%	
14	3111/6423	49%	14	2615/4990	52%	

**Πίνακας 9.3.** Ποσοστά εμφάνισης της μαλτόζης στα τελικά προϊόντα, και αναλογία της μαλτόζης σε σχέση με το σύνολο των παραγόμενων προϊόντων, για το "συμμετρικό" και "πραγματικό" μοντέλο (για ένα εύρος υποστρωμάτων μεγέθους *s*).

Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μαλτόζης για το "συμμετρικό μοντέλο" κινείται σε ένα μικρό εύρος τιμών, 47-54%, το οποίο είναι ανεξάρτητο του *s* ή του αριθμού των τελικών προϊόντων. Συνεπώς, ανεξάρτητα της αύξησης του *s* και του αριθμού των υδρολύσεων (*w*), το ποσοστό

παραγόμενης μαλτόζης θα παραμένει σε αυτό το εύρος. Αυτό σημαίνει ότι έχουμε μία πολύ καλή θεωρητική προσέγγιση του ποσοστού μαλτόζης.

Ωστόσο, το μόριο του αμύλου περιλαμβάνει και άλλου τύπου αλυσίδες γλυκόζης, τις πλευρικές (ή διακλαδιζόμενες) αλυσίδες που περιέχουν και α- $(1 \rightarrow 6)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς, με χαρακτηριστικότερο το μόριο της αμυλοπηκτίνης. Σε αυτή την περίπτωση, το μοντέλο που αναπτύξαμε δεν προβλέπει τη δράση του ενζύμου της α-αμυλάσης για τέτοιου είδους υποστρώματα. Ωστόσο, προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα του μοντέλου με τα πειραματικά μας δεδομένα, θα πρέπει να κάνουμε μία παραδοχή για το μόριο της αμυλοπηκτίνης. Πιο συγκεκριμένα, θεωρούμε ότι η αμυλοπηκτίνη είναι ένα άθροισμα ανεξάρτητων γραμμικών αλυσίδων γλυκόζης. Η παραπάνω υπόθεση εξηγείται πιο αναλυτικά στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 9.7.):



Σχήμα 9.7. Απλοποιημένη μορφή της γεωμετρίας του μορίου της αμυλοπηκτίνης, όπου κάθε διακλάδωση παρουσιάζεται ως άθροισμα τριών γραμμικών αλυσίδων γλυκόζης (a, b & c), και τα αναγωγικά και μη-αναγωγικά άκρα συμβολίζονται ως R και NR, αντίστοιχα.

Εν τέλει, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του μοντέλου με τα πειραματικά δεδομένα παρατηρούμε ότι τα ποσοστά παραγόμενης μαλτόζης είναι πολύ κοντά στις προβλέψεις του

μοντέλου. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι με τη δράση της α-αμυλάσης (μόνη της), το ποσοστό παραγόμενης μαλτόζης πλησίαζε το 40%. Το μοντέλο έδειξε ότι έχοντας ως υπόστρωμα το μόριο της αμυλόζης, το ποσοστό της παραγόμενης μαλτόζης κυμαίνεται μεταξύ 47-54%. Ωστόσο, στα πειράματά μας το υπόστρωμα ήταν αρκετά πολύπλοκο, το οποίο εκτός των δύο βασικών δομικών μονάδων του αμύλου (αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη) περιέχει και μια μεγάλη ποικιλία συστατικών που ενδεχομένως έδρασαν παρεμποδιστικά ως προς την αντίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης. Επομένως, δικαιολογείται η απόκλιση μεταξύ του μοντέλου (47-54%) και των πειραματικών δεδομένων (~40%) ως προς το ποσοστό παραγόμενης μαλτόζης, αφενός λόγω της παρουσίας α-(1→6) γλυκοζιτικών δεσμών, και αφετέρου λόγω της παρεμποδιστικά αναφέρονται οι διαιτητικές ίνες.

## **V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

#### 10.1. Συμπεράσματα διατριβής

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι κινητικές της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου βρώμης, με τη δράση των ενζύμων της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης (σε συνδυασμό και ξεχωριστά), με σκοπό τη βελτιστοποίηση της γραμμής παραγωγής που ακολουθείται σε μία βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης. Σε πρώτη προσομοίωση σε εργαστηριακή κλίμακα προσδιορίστηκαν τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης (χρήση ενζυμικού κυτίου γλυκόζης και μεθόδου HPLC), με έμφαση στον δισακχαρίτη της μαλτόζης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η περίπτωση της συνδυασμένης δράσης των δύο αμυλασών, η οποία δημιούργησε ενδείξεις ενδεχόμενων φαινομένων συνέργειας μεταξύ των δύο ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψε το υψηλότερο ποσοστό μαλτόζης (60%) στο σύνολο των προϊόντων της υδρόλυσης, αφενός διότι η β-αμυλάση απελευθερώνει επιτυχώς μονάδες β-μαλτόζης από τα μη-αναγωγικά άκρα των αλυσίδων γλυκόζης, και αφετέρου διότι η α-αμυλάση ενισχύει την παραγωγή μαλτόζης, ενεργώντας με τυχαίο τρόπο σε μεγάλες γραμμικές αλυσίδες κατά το αρχικό στάδιο της υδρόλυσης. Επιπλέον, ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά μαλτόζης παρατηρήθηκαν όταν η βαμυλάση δρούσε μόνη της. Ωστόσο, τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης από τη δράση της ααμυλάσης (μόνη της) ήταν η μαλτόζη (35%) και η μαλτοτριόζη (25%), ενώ η γλυκόζη και η μαλτοτετραόζη εμφανίστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Επιπρόσθετα, μελετώντας τρία κοκκομετρικά κλάσματα αλεύρου βρώμης (>500μm, 500μm>κλάσμα>250μm, <250μm) ως προς τις κινητικές της υδρόλυσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα παραγόμενης μαλτόζης και μαλτοτριόζης. Σε αντίθεση, σημειώθηκε διαφοροποίηση ως προς τη σύσταση κάθε κοκκομετρικού κλάσματος. Εξετάζοντας τη συγκέντρωση του ολικού αμύλου πριν και μετά την υδρόλυση, το μεσαίο κοκκομετρικό κλάσμα παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης (70,5%), παρόλο που το υψηλότερο αρχικό ποσοστό αμύλου (75,4%) συναντάται στο περισσότερο λεπτόκοκκο κλάσμα αλεύρου (κλάσμα<250μm). Ωστόσο, το χονδρόκοκκο κλάσμα το οποίο είναι και το πιο πλούσιο σε β-γλυκάνες (6,3 g/100g αλεύρου), δεν παρουσίασε υψηλές τάσεις υδρόλυσης (~68%), λόγω της χαμηλής του περιεκτικότητας σε άμυλο (53,5 g/100g αλεύρου βρώμης). Επιπλέον, εξετάζοντας το χρώμα στα υδρολύματα χυλού βρώμης τόσο για το συνολικό άλευρο βρώμης όσο και για τα

τρία κοκκομετρικά κλάσματα, δεν βρέθηκαν διαφορές, αλλά μόνο για το λεπτόκοκκο κλάσμα, το οποίο παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές για τις παραμέτρους L\* και b\*.

Μελετώντας τη ρεολογική συμπεριφορά των δύο αμυλασών (μεταβολή του ιξώδους συναρτήσει του χρόνου για το υδατικό αιώρημα βρώμης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης των αλεύρων), παρατηρήθηκε ότι κυρίως το ένζυμο της α-αμυλάσης μετέβαλε τη ρεολογική συμπεριφορά των υδατικών εναιωρημάτων αλεύρου βρώμης, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προκαλέσει μία απότομη ελάττωση στο ιξώδες του διαλύματος. Ωστόσο, η συνδυασμένη δράση της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης δεν επέδειξε διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με την περίπτωση όπου η β-αμυλάσης δεν επέδειξε διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με την περίπτωση όπου η β-αμυλάση ενεργούσε μόνη της. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη της ρεολογικής συμπεριφοράς των τριών κλασμάτων αλεύρων, ξεχωριστά. Το υψηλότερο επίπεδο μείωσης του ιξώδους παρατηρήθηκε για το πιο λεπτόκοκκο κλάσμα (<250μm), το οποίο έιναι και το περισσότερο πλούσιο σε άμυλο, με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες. Το χονδρόκκοκο κλάσμα (μέγεθος μορίων>500 μm) εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα ιξώδους, ενώ το λεπτόκοκκο κλάσμα (μέγεθος μορίων>500 μm) παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές ιξόδους καθόλη τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης. Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε μία άμεση συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε άμυλο και β-γλυκάνες, πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση.

Επίσης, μελετήθηκε και η ρεολογική συμπεριφορά στα υπερκείμενα στρώματα των υδρολυμάτων των αλεύρων βρώμης (συνολικό άλευρο και τρία κλάσματα) μετρώντας το φαινομενικό ιξώδες (η) (εύρος ρυθμού διάτμησης, από 0,01 έως 1000 s<sup>-1</sup>, στους 25 °C). Παρατηρήθηκε ότι σε μικρές τιμές ρυθμού διάτμησης η συμπεριφορά είναι Νευτώνεια. Συγκεκριμένα, το λεπτόκοκκο κλάσμα παρουσίασε σχεδόν Νευτώνεια συμπεριφορά, ενώ το συνολικό άλευρο βρώμης και τα άλλα δύο κοκκομετρικά κλάσματα παρουσίασαν την τυπική ψευδοπλαστική συμπεριφορά, με συνεχή μείωση του ιξώδους για ένα μεγάλο εύρος ρυθμού διάτμησης (0,1-1000 s<sup>-1</sup>). Σε γενικές γραμμές, ανεξαρτήτως του μεγέθους των μορίων του αλεύρου, τα δείγματα παρουσίασαν μια ρεολογική συμπεριφορά η οποία είναι χαρακτηριστική για τα ψευδοπλαστικά ρευστά.

Για ορισμένα δείγματα (συνολικό άλευρο και χονδρόκοκκο κλάσμα με μέγεθος πόρων>500μm) μελετήθηκε η ρεολογική συμπεριφορά και για ένα εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών (10-50 °C), όπου και για τις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι το ιξώδες μειωνόταν αυξανομένης της θερμοκρασίας. Η εξάρτηση του ιξώδους από τη θερμοκρασία περιγράφτηκε από την εξίσωση
Αιτhenius, παρατηρώντας ότι η καμπύλη και για τα δύο διαγράμματα Arthenius τοποθετήθηκε κάτω από τον άξονα x, λαμβάνοντας αρνητικές τιμές (για έναν σταθερό ρυθμό διάτμησης, ίσο με 92,4 s<sup>-1</sup>). Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι ενέργειες ενεργοποίησης ( $E_a$ ), μέσω της καμπύλης που αναπαριστά τη σχέση μεταξύ του log( $\eta$ ) και του (1/T), τόσο για το χονδρόκοκκο κλάσμα όσο και για το συνολικό άλευρο βρώμης. Τέλος, μελετώντας τα μηχανικά φάσματα για το συνολικό άλευρο βρώμης. Τέλος, μελετώντας τα μηχανικά φάσματα για το συνολικό άλευρο βρώμης. Τέλος, μελετώντας τα μηχανικά φάσματα για το συνολικό άλευρο βρώμης. Τέλος, μελετώντας τα μηχανικά φάσματα για το συνολικό άλευρο βρώμης στα τρία κοκκομετρικά κλάσματα (υδρολύματα), συμπεράναμε ότι τα υδρολύματα παρουσίασαν την κλασική ιξωδοελαστική συμπεριφορά που παρουσιάζουν όλα τα υδατικά συστήματα διασποράς μακρομορίων, όπου το G΄΄ (ιξώδης συνιστώσα) ήταν μεγαλύτερο από το G΄ (συνιστώσα ελαστικότητας). Σε γενικές γραμμές, οι τιμές των συνιστωσών G΄ και G΄΄ παρουσίασαν μία σημαντική εξάρτηση από τη συχνότητα, και πιο συγκεκριμένα, αυξάνονταν αναλογικά με τη συχνότητα, πράγμα το οποίο συνέβη για όλα τα υδρολύματα το δυρολύματα δεν επέδειξαν Νευτώνεια συμπεριφορά, διότι η τιμή του σύνθετου ιξώδους δεν ήταν σταθερή, αλλά μεταβαλλόταν αντιστρόφως ανάλογα με την αύξηση της συχνότητας.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την ανομοιογένεια (ως προς τη χημική δομή και σύσταση) που παρατηρείται στα άλευρα και τα κοκκομετρικά κλάσματα αυτών, που μελετήθηκαν. Το ιξώδες, καθώς επίσης και τα δυναμικά φάσματα των υδρολυμάτων σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το μοριακό βάρος, το μέγεθος και το σχήμα των μορίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η παρουσία των γραμμικών ομοπολυσακχαριτών, των β-γλυκανών, που περιέχονται στο δημητριακό σπόρο της βρώμης. Τα χημικά χαρακτηριστικά των β-γλυκανών των δημητριακών αντικατοπτρίζονται στις ρεολογικές τους ιδιότητες με το νερό. Επίσης, το μοριακό βάρος (MB) και τα δομικά τους χαρακτηριστικά παίζουν σημαντικό ρόλο, επηρεάζοντας τη διαλυτότητά τους (Lazaridou et al., 2007).

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου βρώμης, και εν συνεχεία η γραμμή παραγωγής που ακολουθείται στη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης, αναπτύχθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο το οποίο αποτελεί εφαρμογή της τροποποιημένης μορφής της εξίσωσης του Boltzmann, με απώτερο σκοπό την προσομοίωση της δράσης του ενζύμου της α-αμυλάσης στο μόριο του αμύλου. Εντοπίστηκε μία λογαριθμική σχέση μεταξύ της πολλαπλότητας των υδρολύσεων (multiplicity, w) και του μεγέθους των μορίων (s) (ανά μονάδα μορίων γλυκόζης) του υποστρώματος, ως προς τα προϊόντα της υδρόλυσης. Σε πρώτη φάση, το υπόστρωμα ήταν ευθείες αλυσίδες μορίων γλυκόζης (αμυλόζη), αλλά στη συνέχεια, κάνοντας κάποιες παραδοχές, μπορούσε να εφαρμοστεί και για πιο πολύπλοκα και διακλαδισμένα μόρια (αμυλοπηκτίνη). Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε πρόβλεψη της εμφάνισης του προϊόντος της μαλτόζης και τα αποτελέσματα του μοντέλου συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα, και διαπιστώθηκε ικανοποιητική προσέγγιση. Σε γενικές γραμμές, το μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει την τυχαία δράση του ενδο-ενζύμου της ααμυλάσης, ως προς τα τελικά, άλλα και ενδιάμεσα προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου.

Σε δεύτερη φάση ασχοληθήκαμε με το απόβλητο από τη βιομηχανία παραγωγής γάλακτος βρώμης, με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας της υπερδιήθησης για το διαχωρισμό αλλά και την ανάκτηση των β-γλυκανών από πρότυπα διαλύματα β-γλυκάνης και από το απόβλητο βρώμης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι μεμβράνες RC παρουσίασαν τους υψηλότερους συντελεστές ανάκτησης, ενώ οι μεμβράνες PES παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές πυκνότητας ροής και διαπερατότητας. Ωστόσο, η εφαρμογή και των δύο μεμβρανών περιορίστηκε από την απορρόφηση πολικών β-γλυκανών στην επιφάνειά τους. Αυτό το φαινόμενο οδήγησε σε αρκετά χαμηλές τιμές ανάκτησης ροής (FR), με αποτέλεσμα την πιθανή υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης. Από την άλλη μεριά, οι μεμβράνες PS παρουσίασαν ικανοποιητική συγκράτηση, καθώς επίσης και ικανοποιητικές τιμές πυκνότητας ροής, διαπερατότητας και ανάκτησης ροής, ειδικότερα στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση των β-γλυκανών ήταν χαμηλότερη των 600 mg/L. Ομοίως, η εφαρμογή των PS μεμβρανών στη μονάδα εφαπτομενικής ροής αντί του κελιού κάθετης ροής, είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της συγκράτησης των β-γλυκανών, καθώς και των αντίστοιζων τιμών FR, χωρίς να σημειωθεί σημαντική μείωση της πυκνότητας ροής του διηθήματος.

Έπειτα, η εφαρμογή των PS μεμβρανών στο σύστημα εφαπτομενικής ροής εφαρμόστηκε και για τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης (μέσω εκχύλισης), σε συγκέντρωση β-γλυκανών μικρότερη των 600 mg/L. Τα αποτελέσματα επέδειξαν ότι η εφαρμογή της υπερδιήθησης σε υψηλές τιμές πιέσεων (TMP) (π.χ. 3 bar) προκάλεσε διάρρηξη της μεμβράνης, το οποίο αποδείχθηκε από τις αρκετά υψηλές τιμές πυκνότητας ροής, αλλά και από την έντονα αυξανόμενη διαπερατότητα. Αυτή η επίδραση δεν ήταν τόσο έντονη σε χαμηλές τιμές TMP και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλυμένων ουσιών. Η διεργασία της υπερδιήθησης εφαρμόστηκε για τη βέλτιστη τιμή TMP (2 bar), με στόχο να ανακτηθούν οι β-γλυκάνες από τα προαναφερθέντα διαλύματα τροφοδοσίας, μελετώντας παράλληλα και τον διαχωρισμό τους από άλλες οργανικές και ανόργανες διαλυμένες ουσίες. Μέσω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, συμπεράναμε ότι η βελτιστοποίηση της διεργασίας της υπερδιήθησης (μεμβράνη PS, μονάδα εφαπτομενικής ροής, TMP ίση με 2 bar, και συγκέντρωση

β-γλυκανών<600 mg/L) θα μπορούσε να εφαρμοστεί με στόχο την ανάκτηση των β-γλυκανών από τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης, καθώς και τον διαχωρισμό τους από μικρότερες ουσίες, οργανικής και ανόργανης προέλευσης. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα της διεργασίας ήταν ο χαμηλός βαθμός διαχωρισμού μεταξύ των β-γλυκανών και άλλων μακρομορίων. Το συγκεκριμένο πρόβλημα αφορά κατά κύριο λόγο τις πρωτεΐνες, δεδομένου ότι τα διαλύματα τροφοδοσίας που ανακτήθηκαν από το απόβλητο βρώμης δεν περιείχαν σημαντικά ποσοστά άλλων διαιτητικών ινών, πέραν των β-γλυκανών. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να βελτιωθεί η διαδικασία της εκχύλισης, ως προς το ποσοστό των εκχυλισμένων β-γλυκανών και ως προς την απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Βέβαια, η ανάκτηση των β-γλυκανών θα μπορούσε να συνδυαστεί και με την ανάκτηση των πρωτεϊνών βρώμης, καθότι έχει γίνει εκτενής αναφορά ως προς την ανώτερη θρεπτική αξία των πρωτεϊνών (Webster, 2002, Lazaridou et al., 2007).

#### 10.2. Προοπτικές έρευνας

Η συγκεκριμένη διατριβή θα μπορούσε να επεκταθεί, και γι' αυτό το λόγο προτείνεται μελλοντική έρευνα στα παρακάτω πεδία:

- Μελέτη και ανάπτυξη διεργασιών εκχύλισης των διαιτητικών ινών βρώμης από τα απόβλητα βιομηχανιών, διαφοροποιώντας τις συνθήκες εκχύλισης (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση, διάρκεια εκχύλισης), με σκοπό τη βελτιστοποίηση της εκχύλισιμότητάς τους.
- Εφαρμογή της συνδυασμένης διεργασίας μικροδιήθησης-νανοδιήθησης (σε σύστημα εφαπτομενικής ροής) για διαλύματα τροφοδοσίας που προέρχονται από απόβλητα βιομηχανιών δημητριακών χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη μέθοδο εκχύλισης, προκειμένου να ανακτηθούν συστατικά ανώτερης θρεπτικής αξίας.
- Μελέτη ενσωμάτωσης των ανακτηθέντων ωφέλιμων συστατικών (β-γλυκανών) ως πρόσθετα σε γαλακτοκομικά (dairy products) και μη-γαλακτοκομικά προϊόντα (non-dairy products), ενισχύοντας σημαντικά τη θρεπτική τους αξία.
- Μελέτη πρόβλεψης της συνδυασμένης δράσης της α-αμυλάσης και β-αμυλάσης στο άμυλο αναπτύσσοντας ένα μαθηματικό μοντέλο, ικανό να βελτιστοποιήσει ποικίλες ενζυμικές διεργασίες που ακολουθούνται σε βιομηχανίες τροφίμων και ποτών.

# ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά:

#### Δημοσιευμένες εργασίες της διατριβής:

Patsioura, A., Reppas, E., Maniatis, G. & Gekas, V. (2008). Applying Boltzmann Equation to Starch Enzymatic Hydrolysis Modeling. *WSEAS TRANSACTIONS on BIOLOGY and BIOMEDICINE*, 5 (12), 322-332.

### <u>Σχετικές εργασίες προς δημοσίευση</u>:

Patsioura, A., Gekas, V., Lazaridou, A. & Biliaderis, C. (2011). Kinetics of heterogeneous amylolysis in oat flour and characterization of hydrolyzates. *Manuscript*.

Patsioura, A., Galanakis, C. M. & Gekas, V. (2011). Ultrafiltration optimization for the recovery of  $\beta$ -glucan from oat milk waste. *Manuscript*.

### Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια:

Patsioura, A. & Gekas, V. "A study of Oat-origin Enzymatic Hydrolysis". 3<sup>rd</sup> IASME/WSEAS International Conference on ENERGY & ENVIRONMENT (EE'08), Univ. of Cambridge, UK, 23-25 February 2008.

Patsioura, A., Grillakis E. & Gekas, V. "Recovery of beta-glucans from industrial starch effluents through appropriate unit operations". *3<sup>rd</sup> IASME/WSEAS International Conference on ENERGY & ENVIRONMENT (EEESD'08)*, Univ. of Cambridge, UK, 23-25 February 2008.

Patsioura, A., and Gekas, V. "A study of Oat-origin Enzymatic Hydrolysis". 4<sup>th</sup> WSEAS/IASME International Conference on ENERGY, ENVIRONMENT, ECOSYSTEMS and SUSTAINABLE DEVELOPMENT (EE'08), Faro, Algarve, Portugal, 11-13 June 2008.

Patsioura, A., Reppas, E., Maniatis G. & Gekas, V. "Applying Boltzmann Equation to Starch Enzymatic Hydrolysis Modeling". 2<sup>nd</sup> WSEAS International Conference on ENGINEERING MECHANICS, STRUCTURES and ENGINEERING GEOLOGY (EMESEG'09), Rodos, Greece, 22-24 July 2009.

Patsioura, A., Gekas, V., Lazaridou, A. & Biliaderis, C. G. "Study of Enzymatic hydrolysis & characterization of oat flour hydrolyzates".  $\delta^{th}$  European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop, Viterbo, Italy, 3-5 August 2009.

## Ελληνικά Επιστημονικά Συνέδρια:

Πατσιούρα, Α. & Γκέκας, Β. "Μελέτη ενζυματικής υδρόλυσης αμύλου βρώμης". 2° Πανελλήνιο Συνέδριο 'Βιοτεχνολογία & Τεχνολογία Τροφίμων', Αθήνα, 29-31 Μαρτίου 2007.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

#### Διεθνής βιβλιογραφία

Ahmad, A. L., Ismail, S. & Bhatia, S. (2005). Ultrafiltration behavior in the treatment of agroindustry effluent: Pilot scale studies. *Chemical Engineering Science*, 60, 5385-5394.

Ajandouz, E. H., Abe, J-I., Svensson, B., Marchis-Mouren, G. (1992). Barley malt-α-amylase: Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using *p*-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1159, 198-202.

Al-Rabadi, G. J. S., Gilbert, R. G. & Gidley, M. J. (2009). Effect of particle size on kinetics of starch digestion in milled barley and sorghum grains by porcine *alpha*-amylase. *Journal of Cereal Science*, 50, 198-204.

Alriols, G. M., García, A., Llano-ponte, R. & Labidi, J. (2010). Combined organosolv and ultrafiltration lignocellulosic biorefinery process. *Chemical Engineering Journal*, 157, 113-120.

Andersson, K. E., Immerstrand, T., Swärd, K., Bergenståhl, B., Lindholm, M. W., Öste, R. & Hellstrand, P. (2010). Effects of oats on plasma cholesterol and lipoproteins in C57BL/6 mice are substrain specific. *British Journal of Nutrition*, 103, 513-521.

Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R. & Hristozova, T. (2006). Development of a new oatbased probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 75-80.

Anon, (1987). Measurement of the starch content of commercial starches. Starch, 39, 414-416.

AOAC. (1990a). Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ed. Method 975.03. Metals in Plants and Pet Foods (pp. 42-43). Arlington, VA:AOAC.

Apar, D. K. & Özbek, B. (2004). α-Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 39, 1137-1144.

Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U. & Legge, R. L. (2007). A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79, 950-955.

Banks, W. & Greenwood, C. T. (1975). Starch and its components. *Edinburgh University Press*, Edinburgh, pp. 22-54, 191-233, 267-273.

BeMiller, J. N. & Whistrler, R. L. Carbohydrates. In: Fennema, O. R. (Ed.). (1996). Food Chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, pp. 191.

BeMiller, J. N. (1997). Starch modification: Challenges and Prospects. *Starch/Stärke*, 49(4), 127-131.

Bertoft, E. & Manelius, R. (1992). A method for the study of the enzymatic hydrolysis of starch granules. *Carbohydrate Research*, 227, 269-283.

Besselink, T., Baks, T., Janssen, A. E. M. & Boom, R. M. (2008). A stochastic model for predicting dextrose equivalent and saccharide composition during hydrolysis of starch by α-amylase. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4), 684-697.

Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543.

Braaten, J. T., Scott, F. W., Wood, P. J., Riedel, K. D., Wolynetz, M. S., Brule, D. & Collins, M.W. (1994). High beta-glucan oat bran and oat gum reduce postprandial blood-glucose and insulin in subjects with and without type-2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 11, 312-318.

Brandam, C., Meyer, X. M., Proth, J., Strehaiano, P. & Pinguad, H. (2002). A new reaction scheme for the starch hydrolysis and temperature policy influence during mashing. *Food Science and Biotechnology*, 11(1), 40-47.

Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W. & Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 30-42.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.

Burrows, V. D. Breeding oats for food and feed: Conventional and new techniques and materials. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and technology, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 43-44.

Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 438-443.

Closs, C. B., Conde-Petit, B., Roberts, I. D., Tolstoguzov, V. B. & Escher, F. (1999). Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. *Carbohydrate Polymers*, 39, 67-77.

Collins, F. W., Oat phenolics: Structure, occurrence, and function. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 227, 294-295.

Colonna, P., Leloup, V. & Buléon, A. (1992). Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S17-S32.

Crabb, W. D. & Mitchinson, C. (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*, 15, 349-352.

Cui, R. & Oates, C. G. (1999). The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. *Food Chemistry*, 65, 417-425.

Dean, M., Shepherd, R., Arvola, A., Vassallo, M., Winkelmann, M., Claupein, E., Lähteenmäki, L., Raats, M. M. & Saba, A. (2007). Consumer perceptions of healthy cereal products and production methods. *Journal of Cereal Science*, 46, 188-196.

Domagala, J., Sady, M., Grega, T. & Bonczar, G. (2006). Rheological properties and texture of yoghurts when oat-maltodextrin is used as a fat substitute, *International Journal of Food Properties*, 9, 1-11.

Doyle, E. M., Noone, A. M., Kelly, C. T., Quigley, T. A. & Fogarty, W. M. (1998). Mechanisms of action of the maltogenic α-amylase of *Byssochlamys fulva*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 612-616.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Duedahl-Olesen, L., Pedersen, L. H. & Larsen, K. L. (2000). Suitability and limitations of methods for characterization of activity of malto-oligosaccharide-forming amylases. *Carbohydrate Research*, 329, 109-119.

Eijsink, V. G. H., Gåseidnes, S., Borchert, T. V. & van den Burg, B. (2005). Directed evolution of nzyme stability. *Biomolecular Engineering*, 22, 21-30.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

FAO/WHO. (2009). Joint FAO/WHO food standards programme. Codex Alimentarius Commision 32<sup>nd</sup> session. Report of the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. *ALINORM 09/332/26, Part B Provisions on Dietary Fibre*, para 54 and Appendix II.

Faulds, C. B., Bartolome, B. & Williamson, G. (1997). Novel biotransformations of agroindustrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Industrial Crops and Products*, 6, 367-374.

FDA. Food labeling: health claims; oats and coronary heart disease. (1996). Federal Register 61, 296-337.

Folin, O., & Ciocalteau, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.

Franco, C. M. L., Preto, S. J. doR, Ciacco, C. F. & Tavares, D. Q. (1988). Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 2. Study of the granular structure of starch. *Starch/Stärke*, 40(1), S29-32.

Fulcher, R. G. Morphological and chemical organization of the oat kernel. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 53-69.

Galanakis, C. M., Tornberg, E. & Gekas, V. (2010a). Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. *Journal of Food Engineering*, 99, 190-197.

Galanakis, C. M., Tornberg, E. & Gekas, V. (2010b). Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1018-1025.

Gekas, V., Trägårdh, G. & Hallström, B. (1993). Ultrafiltration membrane performance fundamentals, *Lund University and The Swedish Foundation for Membrane Technology*, Lund, pp.11-14, 45-51.

Gekas, V., Baralla, G. & Flores, V. (1998). Applications of membrane technology in the food industry, *Food Science and Technology International*, 4, 311-328.

Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., Vidal-Valverde, C. (2002). Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214, 226-231.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. & Chauhan, B. (2003). Microbial αamylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38, 1599-1616. Hatzikamari, M., Kyriakidis, D. A., Tzanetakis, N., Biliaderis, C. G. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2007). Biochemical changes during a submerged chickpea fermentation used as a leavening agent for bread production. *European Food Research and Technology*, 224, 715-723.

Helbert, W., Schülein, M. & Henrissat, B. (1996). Electron microscopic investigation of the diffusion of *B. licheniformis* α-amylaseinto corn starch granules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 165-169.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280, 309-316.

Hiromi, K., Ohnishi, M. & Tanaka, A. (1983). Subsite structure and ligand binding mechanism of glukoamylase, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 51, 79-95.

Hoover, R. & Senanayake, S. P. J. N. (1996). Composition and physicochemical properties of oat starches. Food Research International, 29(1), 15-26.

Huisman, I. H., Dutré, B., Persson, K. M. & Trägårdh, G. (1997). Water permeability in ultrafiltration and microfiltration: Viscous and electroviscous effects. *Desalination*, 113, 95-103.

Izydorczyk, M. S. & Dexter, J. E. (2008). Barley β-glucans and aravinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – A Review. *Food Research International*, 41, 850-868.

Jiahua, Z. (1999). Kinetic model for the co-action of  $\beta$ -amylase and debranching enzymes in the production of maltose. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(5), 618-622.

Jones, J. M. Dietary fibre or whole grains or both? In: Salovaara, H., Gates, F. & Tenkanen, M. (Eds). (2007). Dietary fibre. Components and functions. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands, pp. 13-24.

Kahlon, T. S., Chow, F. I., Knuckles, B. E. & Chiu, M. M. (1993). Cereal Chemistry, 70(4), 435-440.

Kalra, S. & Jood, S. (2000). Effect of dietary barley β-glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rats. *Journal of Cereal Science*, 31, 141-145.

Kandra, L. (2003). α-Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 666-667, 487-498.

Katcher, H. I., Legro, R. S., Kunselman, A. R., Gillies, P. J., Demers, L. M., Bagshaw, D. M. & Kris-Etherton, P. M. (2008). The effects of a whole grain-enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 79-90.

Kim, W-W. & Yoo, B. (2009). Rheological behaviour of acorn starch dispersions: effects of concentration and temperature. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 503-509.

Kong, B-W., Kim, J-I., Kim, M-J. & Kim J-C. (2003). Porcine pancreatic α-amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnology Progress*, 19, 1162-1166.

Konsula, Z. & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an αamylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39, 1745-1749.

Koyama, I., Komine, S., Yakushijin, M., Hokari, S. & Komoda, T. (2000). Glycosylated salivary α-amylases are capable of maltotriose hydrolysis and glucose formation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126, 553-560.

Kwon, B., Shon, H. K. & Cho, J. (2009). Investigating the relationship between model organic compounds and ultrafiltration membrane fouling. *Desalination and Water Treatment*, 8, 177-187.

Lambo-Fodje, A. M. (2006). Dietary fibre in fermented oats and barley. *PhD Thesis*. Lund University, Lund, pp. 2.

Laufenberg, G., Kunz, B. & Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, 167-198.

Lazaridou, A., Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (2003). Molecular size effects on rheological properties of oat  $\beta$ -glucan in solution and gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 693-712.

Lazaridou, A., Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. Cereal β-glucans: Structures, physical properties, and physiological functions. In: Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (Eds). (2007). Functional food carbohydrates, *CRC Press*, Boca Raton, FL, pp. 2-6, 21-31, 41.

Lazaridou, A., Chornick, T., Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (2008). Composition and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by sequential extraction with water, malt enzymes, and alkali. *Journal of Cereal Science*, 48, 304-318.

Leloup, V. M., Colonna, P. & Ring, S. G. (1991). α-Amylase adsorption on starch crystallites. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 127-134.

Leman, P., Goesaert, H., Vandeputte, G. E., Lagrain, B. & Delcour, J. A. (2005). Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 62, 205-213.

Leman, P., Bijttebier, A., Goesaert, H., Vandeputte, G. E. & Delcour, J. A. (2006). Influence of amylases on the rheological and molecular properties of partially damaged wheat starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1662-1669.

Li, J. H., Vasanthanan, T., Hoover, R. & Rossnagel, B. G. (2004). Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by αamylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*, 84, 621-632.

Lindahl, L., Ahlden, I., Öste, R. & Sjöholm, I. (1997). Homogenous and stable cereal suspension and method of making same. US Patent 5686123.

Lockhart, H. B. & Hurt, H. D. Nutrition of oats. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 297-308.

López, C., Torrado, A., Fuciños, P., Guerra, N. P. & Pastrana, L. (2006). Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylases mixture. Enzyme and Microbial Technology, 39, 252-258.

Ma, Y., Cai, C., Wang, J. & Sun, D-W. (2006). Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetics, *Journal of Food Engineering*, 73, 297-303.

MacArthur-Grant, L. A. Sugars and nonstarchy polysaccharides in oats. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 75, 88.

MacGregor, E. A., MacGregor, A. W., Marci, L. J. & Morgan, J. E. (1994). Models for the action of barley alpha-amylase isozymes on linear substrates. *Carbohydrate Research*, 257, 249-268.

Mahasukhonthachat, K., Sopade, P. A. & Gidley, M. J. (2010). Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size. *Journal of Food Engineering*, 96, 18-28.

Marchal, L. M., van de Laar, A. M. J., Goetheer, E., Schimmelpennink, E. B., Bergsma, J., Beeftink, H. H. & Tramper, J. (1999). Effect of temperature on the saccharide composition obtained after  $\alpha$ -amylolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(3), 344-355.

Marchal, L. M., Zondervan, J., Bergsma, J., Beeftink, H. H. & Tramper, J. (2001). Monte Carlo simulation of the α-amylolysis of amylopectin potato starch. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24, 163-170.

Marrs, B., Delagrave, S. & Murphy, D. (1999). Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 241-245.

Mårtensson, O., Öste, R. & Holst, O. (2002). The effect of yogurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Research International*, 35, 775-784.

Mårtensson, O., Biörklund, M., Lambo, A. M., Dueñas-Chasco, M., Irastorza, A., Holst, O., Norin, E., Welling, G., Öste, R. & Önning, G. (2005). *Nutrition Research*, 25, 429-442.

Martin, C. & Smith, A. M. (1995). Starch biosynthesis. The Plant Cell, 7, 971-985.

Maximous, N., Nakhla, G. & Wan, W. (2009). Comparative assessment of hydrophobic and hydrophilic membrane fouling in wastewater applications. *Journal of Membrane Science*, 339, 93-99.

McCleary, B. V. & Glennie-Holmes, M. (1985). Enzymic quantification of  $(1-3)(1-4)-\beta$ -D-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 285-295.

Morales, S., Álvarez, H. & Sanchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 25-30.

Mota, M., Teixeira, J.A. & Yelshin, A. (2002). Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations. *Separation and Purification Technology*, 27, 137-144.

Muralikrishna, G. & Nirmala, M. (2005). Cereal α-amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60, 163-173.

Mulder, M. (1996). Principles of Membrane Technology, *Kluwer Academic Publishers*, Enschede, pp. 280-308, 416-417, 474-478.

Nascimento, J. R. O., Júnior, A. V., Bassinello, P. Z., Cordenunsi, B. R., Mainardi, J. A., Purgatto, E. & Lajolo, F. M. (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 41-47.

Ni, W., Zhang, X., Bi, H., Iteku, J., Ji, L., Sun, C., Fang, J., Tai, G., Zhou, Y. & Zhao, J. (2009). Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity, *Carbohydrate Research*, 344, 2512-2518.

Nielsen, J. E. & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α-amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 253-274.

Nigam, P. & Singh, D. (1995). Enzymes and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 770-778.

Nilsson, M. (2007). Nanofiltration at elevated temperatures: Influence of the combined effects of temperature, salts, pH and cleaning. *PhD Thesis*, Lund University, Lund, pp.1-2.

Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 375-382.

Oliveira do Nascimento, J. R., Júnior, A. V., Bassinello, P. Z., Cordenunsi, B. R., Mainardi, J. A., Purgatto, E. & Lajolo, F. M. (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 41-47.

Önning, G., Åkesson, B., Öste, R. & Lundquist, I. (1998). Effects of consumption of oat milk, soya milk, or cow's milk on plasma lipids and antioxidative capacity in healthy subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 42, 211-220.

Önning, G. Carbohydrates and the risk of cardiovascular disease. In: Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (Eds). (2007). Functional food carbohydrates, *CRC Press*, Boca Raton, FL, pp. 291-299, 311-312.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.

Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M-P., Zakhia, N. & Rios, G. M. (2000). Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 71-77.

Park, J. T. & Rollings, J. E. (1994). Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I. Amylose/Amylopectin α-amylolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 792-800.

Paton, D. Oat starch: Physical, chemical, and structural properties. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 118-119.

Persia, M. E., Parsons, C. M., Schang, M. & Azcona, J. (2003). Nutritional evaluation of dried tomato seeds. *Poultry science*, 82, 141-146.

Peterson, D. M. & Brinegar, A. C. Oat storage proteins. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 176, 197-198.

Philips, G. O. & Cui, S. W. (2011). An introduction: Evolution and finalisation of the regulatory definition of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, 25, 139-143.

Pinelo, M., Jonsson, G. & Meyer, A. S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, 70, 1-11.

Rao, M. A., Okechukwu, P. E., Da Silva, P. M. S. & Oliveira, J. C. (1997). Rheological behavior of heated starch dispersions in excess water: role of starch granule. *Carbohydrate Polymers*, 33, 273-283.

Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.

Robyt, J. F. & French, D. (1967). Multiple attack hypothesis of  $\alpha$ -amylase action: Action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122, 8-16.

Rollings, J. (1985). Enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 5, 37-82.

Sablani, S. S., Goosen, M. F. A., Al-Belushi, R. & Wilf, M. (2001). Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination*, 141, 269-289.

Saha, B. C. & Shen, G-J. (1987). Behavior of a novel thermostable β-amylase on raw starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 598-601.

Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. & Anttila, H. Physical state of soluble oat fibre and health claims. In: Salovaara, H., Gates, F. & Tenkanen, M. (Eds). (2007). Dietary fibre. Components and functions. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands, 2007, pp. 91-101.

Saltzman, E., Das, S. K., Lichtenstein, A. H., Dallal, G. E., Corrales, A., Schaefer, E. J., Greenberg, A. S. & Roberts, S. B. (2001). An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *The Journal of Nutrition*, 131, 1465-1470.

Samborska, K., Guiavarc'h, Y., Van Loey, A. & Hendrickx, M. (2005). The influence of moisture content on the thermostability of *Aspergillus oryzae* α-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 167-174.

Sanroman, A., Murado, M. A. & Lema, J. M. (1996). The influence of substrate structure on the kinetics of the hydrolysis of starch by glucoamylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59, 329-336.

Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. & Mikami, B. (2000). Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35, 711-715.

Saulnier, L., Gevandan, S. & Thibault, J. F. (1994). Extraction and partial characterization of  $\beta$ -glucan from the endosperms of two barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, 19, 171-178.

Schrickel, D. J. Oats production, value, and use. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 1-11.

Señorans, F. J., Ibáñez, E. & Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 507-526.

Shahidi, F., Alasalvar, C. & Liyana-Pathirana, C. M. (2007). Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana L.*) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 55, 1212-1220.

Skendi, A., Biliaderis, C. G., Lazaridou, A. & Izydorczyk, M.S. (2003). Structure and rheological properties of water soluble β-glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science*, 38, 15-31.

Slaughter, S. L., Ellis, P. R. & Butterworth, P. J. (2001). An investigation of the action of porcine pancreatic α-amylase on native and gelatinized starches. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1525, 29-36.

Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs, D. R. & Marquart, L. (1999). Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 459S-463S.

Stevnebø, A., Sahlstrom, S. & Svihus, B. (2006). Starch structure and degree of starch hydrolysis of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 23-38.

Sulaiman, M. Z., Sulaiman, N. M. & Shamel, M. (2001). Ultrafiltration studies on solutions of pectin, glucose and their mixtures in a pilot scale cross-flow membrane unit. *Chemical Engineering Journal*, 84, 557-563.

Svihus, B., Uhlen, A. K. & Harstad, O. M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 303-320.

Tester, R. F., Karkalas, J. & Qi, X. (2004a). Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.

Tester, R. F., Karkalas, J. & Qi, X. (2004b). Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60, 186-195.

Tester, R. F., Qi, X. & Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 39-54.

Thoma, J. A. (1976). Models for depolymerizing enzymes. Application to  $\alpha$ -amylases. *Biopolymers*, 16, 729-746.

Thomas, D. J. & Atwell, A. (1999). Starches. *American Association of Cereal Chemists Inc.*, Minnesota, USA, pp. 7-8.

Toledano, A., García, A., Mondragon, I. & Labidi, J. (2010a). Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Chemical Engineering Journal*, 71, 38-43.

Toledano, A., Serrano, L., García, A., Mondragon, I. & Labidi, J. (2010b). Comparative study of lignin fractionation by ultrafiltration and selective precipitation. *Chemical Engineering Journal*, 157, 93-99.

Tosh, S. M. Factors affecting bioactivity of cereal β-glucans. In: Salovaara, H., Gates, F. & Tenkanen, M. (Eds). (2007). Dietary fibre. Components and functions. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands, 2007, pp. 75-76.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6, 24-27.

Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.

Verschuren, P. M. (2002). Functional Foods: Scientific and global perspectives. *British Journal* of Nutrition, 88(2), S125-S130.

Virkki, L., Johansson, L., Ylinen, M., Maunu, S. & Ekholm, P. (2005). Structural characterization of water-insoluble nonstarchy polysaccharides of oats and barley. *Carbohydrate Polymers*, 59, 357-366.

Volikakis, P., Biliaderis, C. G., Vamvakas, C. & Zerfiridis, G. K. (2004). Effect of a commercial oat-β-glucan concentrate on the chemical, physico-chemical and sensory attributes of a low-fat white-brined cheese product, *Food Research International*, 37, 83-94.

Webster, F. H. Whole-grain oats and oat products. in: Marquart, L., Slavin, J. L. & Fulcher, R.G. (Eds). (2002). Whole-grain foods in health and disease, *AACC Press*, St. Paul, MN, pp. 84-115.

Williamson, G., Belshaw, N. J., Self, D. J., Noel, T. R., Ring, S. G., Cairns, P., Morris, V. J., Clark, S. A. & Parker, M. L. (1992). Hydrolysis of A- and B-type crystalline polymorphs of starch by α-amylase, β-amylase and glucoamylase 1. *Carbohydrate Polymers*, 18, 179-187.

Wojciechowski, P. M., Koziol, A. & Noworyta, A. (2001). Iteration model of starch hydrolysis by amylolytic enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(5), 530-539.

Wood, P. J., Paton, D. & Siddiqui, I. R. (1977). Determination of β-glucan in oats and barley. *Cereal Chemistry*, 54(3), 524-533.

Wood, P. J. Oat β-glucan: Structure, location, and properties. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology, *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 121.

Wood, P. J., Weisz, J. & Blackwell, B. A. (1991). Molecular characterization of cereal  $\beta$ -D-glucans. Structural analysis of oat  $\beta$ -D-glucan and rapid structural evaluation of  $\beta$ -D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry*, 68(1), 31-39.

Yamasaki, Y. (2003). β-Amylase in germinating millet seeds. *Phytochemistry*, 64, 935-939.

Yankov, D., Dobreva, E., Beschkov, V. & Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 665-667.

Yoo, B. (2006). Steady and dynamic shear rheology of glutinous rice flour dispersions. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 601-608.

Youngs, V. L. Oat lipids and lipid-related enzymes. In: Webster, F. H. (Ed.). (1986). Oats. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, Minnesota, USA, pp. 205-223.

Zawistowski, J. Food regulations: Health claims for foods fortified with carbohydrates or other nutraceuticals. In: Salovaara, H., Gates, F. & Tenkanen, M. (Eds). (2007). Dietary fibre. Components and functions. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands, 2007, pp. 529.

Zhang, T. & Oates, C. G. (1999). Relationship between  $\alpha$ -amylase degradation and physicochemical properties of sweet potato starches. *Food Chemistry*, 65, 157-163.

Zhang, H., Önning, G., Öste-Triantafyllou, A. & Öste, R. (2007). Nutritional properties of oatbased beverages as affected by processing and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2294-2301.

Zhou, Y., Hoover, R. & Liu, Q. (2004). Relationship between α-amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. *Carbohydrate Polymers*, 57, 299-317.

Ziegler, P. (1999). Cereal beta-amylases. Journal of Cereal Science, 29, 195-204.

Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, 40(2), S44-50.

## Ελληνική βιβιογραφία

Γαλανάκης, Χ. (2010). Μελέτη καθαρισμού & ανάκτησης οργανικών συστατικών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση φυσικοχημικών διεργασιών & μεμβρανών διαφορετικών ιδιοτήτων και προέλευσης. Διδακτορική διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, σελ. 41-43.

Γκέκας, Β. & Πρωιμάκη, Σ. Γ. (2001). Φυσικοχημικές Διεργασίες Διαχωρισμών. *Εκδόσεις* Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, σελ. 3-9.

Γκέκας, Β. & Μπαλτά, Κ. Π. (2005). Βιομηχανία τροφίμων και περιβάλλον. *Εκδόσεις Τζιόλα*, Θεσσαλονίκη, σελ. 63, 97-101.

Μπιλιαδέρης, Κ., Λαζαρίδου, Α. & Βαϊκούση, Χ. (2007). β-Γλυκάνες δημητριακών ως συστατικά λειτουργικών τροφίμων: φυσικές ιδιότητες και μεταβολική δράση. Τρόφιμα και Ποτά, *Τρίαινα Εκδοτική*, Θεσσαλονίκη, σελ.1-15.