



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός αμύλου με σκοπό την εκμετάλλευση του
στην οινοποιία



ΣΠΑΝΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Επιβλέπων: Φαρμάκης Λάμπρος

Καλαμάτα 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έχει ως σκοπό να δείξει τις φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν τα σωματίδια αμύλου και το πως αυτά επιδρούν στην οينوποίηση.

Αρχικά θα ασχοληθούμε με τα γενικά χαρακτηριστικά του αμύλου και με μια πιο αναλυτική περιγραφή του, η οποία αφορά τη σύσταση του αμύλου και τις ιδιότητες του. Επίσης θα γίνει αναφορά στα τροποποιημένα άμυλα και στη σχέση που έχει το άμυλο με την βυνοποίηση.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι τεχνικές διαχωρισμού και ανάλυσης των σωματιδίων αμύλου.

Τέλος, παρουσιάζονται:

- ❖ Μελέτη της επίδρασης της πηγής προέλευσης του δείγματος αμύλου στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων αυτού με την τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας φυγοκεντρικού πεδίου.
- ❖ Μελέτη της επίδρασης του pH του μέσου διασποράς στο μέγεθος των σωματιδίων αμύλου.
- ❖ Μελέτη της επίδρασης της ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς στο μέγεθος των σωματιδίων αμύλου.
- ❖ Μελέτη του ρυθμού αύξησης των στελεχών των *Saccharomyces Cerevisiae* με κόκκους αμύλου σίτου ως υποστήριξη για την ακινητοποίηση και παρακολούθηση από καθίζηση πεδίου ροής.
- ❖ Μελέτη της χρήσης του αμύλου ως υπόστρωμα ακινητοποίησης κυττάρων ζύμης για την κατάλυση της αλκοολικής ζύμωσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο	4
1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	4
1.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΜΥΛΟΥ.....	5
1.3 ΑΜΥΛΟΖΗ – ΑΜΥΛΟΠΗΚΤΙΝΗ.....	5
1.4 ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ (gelatinization):	7
1.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΑΜΥΛΑ	9
1.6 ΑΜΥΛΟ ΚΑΙ ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	13
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ – ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	13
ΑΜΥΛΟΥ	13
2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	13
2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ	13
2.3 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ	16
2.4 ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ	17
2.5 ΣΤΕΡΙΚΗ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΔΙΟΥ.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	22
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΜΥΛΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΥΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	30
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ pH ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	35
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο	41
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	41
6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΣΙΤΟΥ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ S. CEREVISIAE	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο	50
ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	50
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	50
7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΗΡΙΞΗΣ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	51
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	61

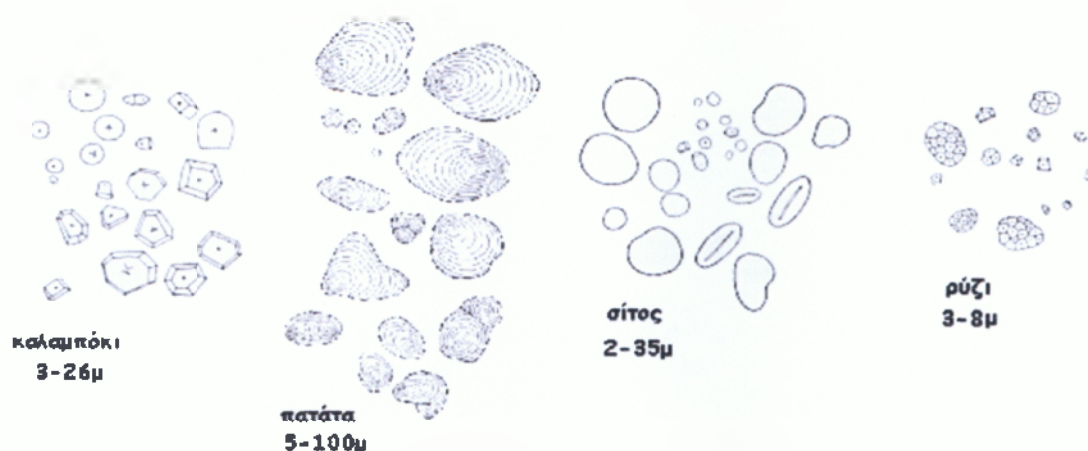
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΤΟ ΑΜΥΛΟ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης. Αποτελείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, που ενώνονται και σχηματίζουν σπειροειδή και διακλαδισμένη αλυσίδα. Το άμυλο αποτελεί αποταμιευτικό πολυσακχαρίτη των φυτών και διασπώμενο αποδίδει μόρια γλυκόζης από τα οποία προμηθεύονται τα κατάλληλα συστατικά για την παραγωγή ενέργειας. Το τροποποιημένο άμυλο, το οποίο δεν είναι γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο, χρησιμοποιείται για να πήξει ένα τρόφιμο χωρίς να χρειαστεί βράσιμο [1]. Το άμυλο είναι γλυκάνη, και αποτελεί το σημαντικότερο τελικό προϊόν της φωτοσύνθεσης, και σε αντίθεση με την κυτταρίνη, η γλυκόζη που το αποτελεί μπορεί με τη βοήθεια των αμυλασών να επανέλθει στο μεταβολισμό του ανθρώπου για κάλυψη ενεργειακών αναγκών ή για σύνθεση άλλων υλικών. Το άμυλο ευρίσκεται υπό μορφή κόκκων (granules) δηλ. «πακέτα» χαρακτηριστικού μεγέθους και σχήματος. Οι κόκκοι του αμύλου ανάλογα με την προέλευσή τους διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τη μορφή, πράγμα που επιτρέπει τη μικροσκοπική αναγνώριση του αμύλου διαφόρων προελεύσεων. Η δομή του κόκκου είναι ψευδοκρυσταλλική, δεν υπάρχει δηλαδή μια σαφής επαναλαμβανόμενη συμμετρία αλλά εμφανίζει περισσότερο τη μορφή ενός θυσάνου από στενά «πλεγμένους» έλικες αμυλόζης και μόρια αμυλοπηκτίνης με ένα κεντρικό σημείο έναρξης [2].



Σχήμα 1.1 Κόκκοι αμύλου από διάφορες πηγές.

1.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΜΥΛΟΥ

Το άμυλο είναι ο σπουδαιότερος υδατάνθρακας των φυτών. Είναι σώμα λευκό, χωρίς γλυκιά γεύση, αδιάλυτο στο κρύο νερό. Στο ζεστό όμως μετατρέπεται σε μια κολλώδη μάζα, που λέγεται αμυλόκολλα και χρησιμοποιείται σαν συγκολλητική ουσία. Το άμυλο βρίσκεται στα διάφορα μέρη των φυτών με τη μορφή αμυλόκοκκων, που ανάλογα με το φυτό διαφέρουν και στο μέγεθος και στο σχήμα. Έτσι με το μικροσκόπιο μπορούμε να καταλάβουμε σε ποιο φυτό ανήκει ο κόκκος.

Σχηματίζεται μέσα στα φυτά με το φαινόμενο της αφομοίωσης ή φωτοσύνθεσης των φυτών, κατά το οποίο τα φυτά, με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός και της χλωροφύλλης (της πράσινης χρωστικής ουσίας των πράσινων φύλλων τους) μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε άμυλο, ενώ συγχρόνως ελευθερώνεται και οξυγόνο. Αν υπάρχει περίσσειμα αμύλου στο φυτό, τότε αυτό αποθηκεύεται στις ρίζες, στους κονδύλους και στα σπέρματα. Πλουσιότερα σε άμυλο είναι τα δημητριακά και οι πατάτες.

Οι αμυλόκοκκοι αποτελούνται από δύο ουσίες:

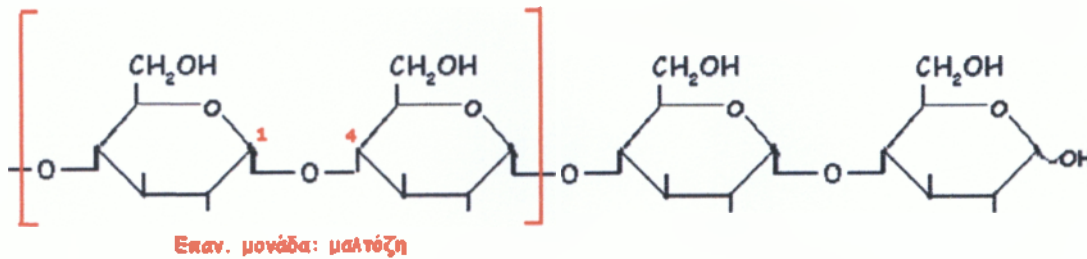
- ❖ την αμυλόζη, που βρίσκεται στο εσωτερικό του κόκκου και αποτελεί τα 10-20% του βάρους του, και
- ❖ την αμυλοπηκτίνη, που βρίσκεται στο περίβλημα και αποτελεί το 80-90% του βάρους του.

Η χρησιμότητα και η αξία του αμύλου για τη ζωή είναι πολύ μεγάλη, γιατί είναι μια από τις σπουδαιότερες θρεπτικές ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το άμυλο μεταφέρεται στο στομάχι και στα έντερα του οργανισμού και εκεί τα διάφορα υγρά το διαλύουν σε απλούστερα μέρη που απορροφούνται από τον οργανισμό, τον τρέφουν και τον αναπτύσσουν. Επίσης το άμυλο χρησιμοποιείται για το κολλάρισμα του χαρτιού και των υφασμάτων και σαν πρώτη ύλη στη βιομηχανία του ψωμιού, του οينوπνεύματος, της γλυκόζης, των δεξτρινών κ.α. [3].

1.3 ΑΜΥΛΟΖΗ – ΑΜΥΛΟΠΗΚΤΙΝΗ

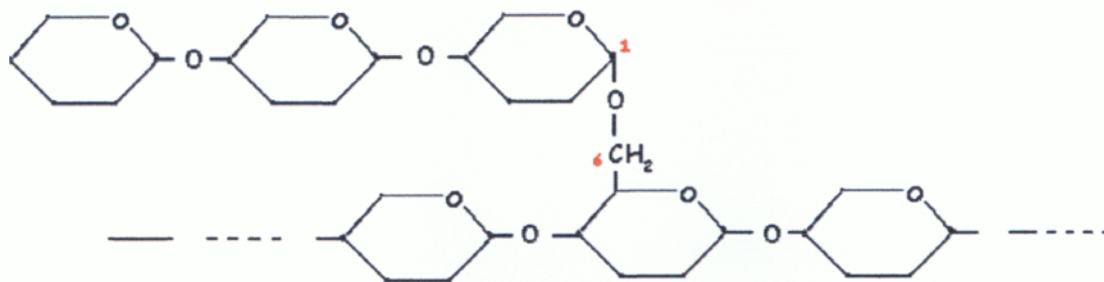
Η αμυλόζη αποτελεί περίπου το 25% του αμύλου. Είναι άλυσος 350-1000 μορίων γλυκόζης (MW=50,000-200,000) διαλυτή στο νερό χωρίς διόγκωση. Τα μόρια γλυκόζης είναι ενωμένα με α(1-4) δεσμούς, σε ευθεία δομή (διαμόρφωση α

έλικα σε διάλυμα). Έχει την ικανότητα φυσικού εγκλεισμού άλλων μορίων π.χ. λιπαρά, ιώδιο (δείκτης αμύλου).



Σχήμα 1.2 Μόριο αμυλόζης.

Η Αμυλοπηκτίνη είναι διακλαδωμένη αλυσος, με πλευρικές αλυσους 20-30 γλυκοζών και βαθμό πολυμερισμού (DP) = χιλιάδες γλυκόζες (MW = 1-10 εκατομύρια). Έχει α(1-4) δεσμούς και α(1-6) δεσμούς (διακλαδώσεις). Βρίσκεται κυρίως στο εξωτερικό του κόκκου του αμύλου. Δε διαλύεται στο νερό αλλά διογκώνεται και με θέρμανση δίνει αμυλόκολλα. Το άμυλο (αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη μαζί) είναι σώμα λευκό, αδιάλυτο στο ψυχρό νερό και στο οινόπνευμα. Στο ζεστό νερό εξ αιτίας της περιεχόμενης αμυλοπηκτίνης το άμυλο διογκώνεται, οι κόκκοι του διαρρηγνύονται και λαμβάνεται ιξώδες υγρό, που κατά την ψύξη γίνεται ζελατινώδες και αποτελεί την κοινή αμυλόκολλα.



Σχήμα 1.3 Μόριο αμυλοπηκτίνης.

Η υδρόλυση του αμύλου μπορεί να γίνει με οξέα ή ενζυμικά. Κατά την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου με διάφορες αμυλάσες (α-αμυλάση, β-αμυλάση, γλυκοαμυλάση) σχηματίζονται ανάλογα με την περίπτωση μαλτόζη, γλυκόζη και οριοδεξτρίνες, που ονομάζονται έτσι γιατί βρίσκονται στο όριο της υδρολυτικής ικανότητας του χρησιμοποιουμένου ενζύμου. Κατά την υδρόλυση του αμύλου με

οξέα λαμβάνεται. ως τελικό προϊόν σχεδόν ποσοτικά η γλυκόζη, που αποτελεί το απλούστερο δομικό τμήμα του μορίου του αμύλου. Κατά την όξινη υδρόλυση του αμύλου σχηματίζονται μερικά ενδιάμεσα προϊόντα με κομμώδη σύσταση και χωρίς καθορισμένη σύνθεση, που ονομάζονται *δεξτρίνες*. Οι δεξτρίνες είναι ένας γενικός όρος για προϊόντα αποικοδομήσεως του αμύλου, που αποτελούν ενδιάμεση βαθμίδα, με ελαττούμενο μοριακό μέγεθος, ανάμεσα στο άμυλο και τους ολιγοσακχαρίτες. Οι δεξτρίνες είναι διαλυτές στο νερό και αδιάλυτες στο οινόπνευμα. Οι δεξτρίνες δεν έχουν γλυκιά γεύση ούτε ζυμώνονται κατ' ευθείαν από τους ζυμομύκητες. Με πλήρη υδρόλυση μετατρέπονται τελικά σε γλυκόζη.

Κατά την όξινη υδρόλυση του αμύλου λαμβάνεται πρώτα το διαλυτό άμυλο ή αμυλοδεξτρίνη, που σχηματίζει ακόμα μπλε χρώμα με ιώδιο. Καθώς προχωρεί η υδρόλυση σχηματίζονται οι ερυθροδεξτρίνες, που με ιώδιο δίνουν κόκκινο χρώμα. Στη συνέχεια της υδρόλυσης σχηματίζονται οι μαλτοδεξτρίνες που δεν δίνουν κανένα χρώμα με το ιώδιο, κατόπιν σχηματίζεται μαλτόζη και τελικά γλυκόζη.

Ευρεία χρήση στη βιομηχανία τροφίμων έχουν τα σιρόπια γλυκόζης που παράγονται από την υδρόλυση αμύλου, κυρίως από καλαμπόκι. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα σιρόπια υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη (High Fructose Corn Syrup- HFCS) που παράγονται με περαιτέρω ενζυμική κατεργασία των σιροπιών γλυκόζης με ισομεράση φρουκτόζης [2].

Παραγωγή αμύλου

- ✓ Πρώτη ύλη: καλαμπόκι
- ✓ Διαβροχή με νερό και 0,2% SO₂ στους 15°C για 35-45 h.
- ✓ Άλεση, αποφλοίωση. Πολτός.
- ✓ Προσθήκη SO₂ και αύξηση της θερμοκρασίας σε 29-33°C.
- ✓ Διαχωρισμός κόκκων αμύλου με φυγοκέντρηση, φιλτράρισμα.
- ✓ Ξήρανση.

1.4 ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ (gelatinization)

Η τεχνολογική χρησιμότητα του αμύλου στα συστήματα τροφίμων προκύπτει από την ιδιότητα του να ζελατινοποιείται.

ΟΡΙΣΜΟΣ: Ως ζελατινοποίηση ορίζεται η μη αντιστρεπτή διόγκωση των κόκκων του αμύλου με νερό κατά την θέρμανσή του πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία. Παρ' όλον ότι αναφερόμαστε στην θερμοκρασία ζελατινοποίησης, Τζ, στην πραγματικότητα το φαινόμενο συμβαίνει σε ένα εύρος περίπου 10°C. Κάθε είδος αμύλου χαρακτηρίζεται από την θερμοκρασία ζελατινοποίησής του, η οποία μπορεί και να μεταβληθεί με τις συνθήκες επεξεργασίας και τη σύνθεση του τροφίμου.

Θερμοκρασία ζελατινοποίησης

Καλαμπόκι	61-72°C
Πατάτα	62-68°C
Σίτος	53-64°C
Ρύζι	65-73°C

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την Τζ είναι το pH, ο ρυθμός θέρμανσης (dQ/dt), και η παρουσία σακχάρων και λιπαρών.

Στάδια ζελατινοποίησης:

α) Κρύο νερό. Κόκκοι αδιάλυτοι. Απορροφούν νερό αντιστρεπτά (μέχρι 25%) και διογκώνονται ελαφρά (9-20%)

β) Με την αύξηση της θερμοκρασίας η δομή του κόκκου σταδιακά μειώνεται, μέχρι το σημείο ζελατινοποίησης, Τζ. Στο Τζ έχουμε απώλεια «κρυσταλλικότητας», αύξηση ιξώδους, ταχεία διόγκωση, μεγάλη συγκράτηση νερού. Διαλυτά μόρια αμυλόζης διαρρέουν από τον κόκκο. Στο σημείο αυτό το φαινόμενο της ζελατινοποίησης είναι μη αντιστρεπτό.

γ) Με συνέχιση της θέρμανσης έχουμε αύξηση διόγκωσης και το διαλυτό άμυλο αυξάνει. Τελικά οι κόκκοι διαρρηγνύονται, το ιξώδες μειώνεται απότομα και οι κόκκοι «συγκολλούνται» μη αντιστρεπτά. Στο σημείο αυτό έχουμε σχηματισμό πηγματος (gel). Τα πηγματα του αμύλου διασπώνται εύκολα με μεγάλες διατμητικές τάσεις και «υγροποιούνται». Το φαινόμενο είναι εν μέρει αντιστρεπτό δηλ. το πήγμα «επανέρχεται». Με παλαιώση προκαλείται έντονη συναίρεση του πηγματος (gel). Όταν το ζελατινοποιημένο άμυλο ψυχθεί, με το χρόνο γίνεται συσσωμάτωση και καθίζηση - αναδιαμόρφωση (retrogradation). Η αναδιαμόρφωση οφείλεται κυρίως

στην αμυλόζη. Στην αναδιαμόρφωση του ζελατινοποιημένου αμύλου οφείλεται εν μέρει το «μπαγιατέμα» (staling) του ψωμιού και των αρτοποιημάτων [2].

Ζελατινοποίηση

- Το άμυλο αδιάλυτο στο νερό
- Με την θέρμανση έχουμε διόγκωση κόκκων
- Η αμυλόζη διαλυτοποιείται
- Οι κόκκοι χάνουν τη διαθλαστικότητα
- Διόγκωση των κόκκων σε θερμοκρασία ζελατινοποίησης

Παλινόρθωση (retro gradation)

- Αργή ψύξη
- Γραμμικά μόρια επανασύνδεση με δεσμούς H
- Τζημα
- Εγκλωβισμός νερού
- Ελάττωση διαλυτότητας και τάση προς επανακρυστάλλωση

1.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΑΜΥΛΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ: Ως τροποποίηση του αμύλου ορίζουμε την ήπια αποικοδόμηση ή φυσική κατεργασία ή αντίδραση των –OH με διάφορες ουσίες (οξικό ανυδρίτη, οξικό βινύλιο, φωσφορικά άλατα) με στόχο τη μεταβολή και βελτίωση των φυσικοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του φυσικού αμύλου. Έχουμε διάφορους τύπους τροποποιημένων αμύλων. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά τα τροποποιημένα άμυλα και οι ιδιότητες τους.

• Τροποποιημένα με οξύ (Acid modified – thin boiling)

Παρουσιάζουν μείωση ιξώδους, αύξηση Τζ, δυνατότητα διάλυσης υψηλής συγκέντρωσης και δίνουν με ψύξη ισχυρά gel. Εφαρμογές: τσίχλες, ζαχαρωτά.

• Εστεροποιημένα – Αιθεροποιημένα

Υδροξυαιθυλωμένα (hydroxyethylated). Βαθμός υποκατάστασης (DS): 0,05-0,1. Παραγωγή: άμυλο + οξειδίο αιθυλενίου, 50°C. Παρουσιάζουν μείωση Τζ,

διόγκωση κόκκων, και δίνουν διαφανή διαλύματα υψηλού ιξώδους που δεν σχηματίζουν gel. Εφαρμογή: δημιουργία πυκνότερων τροφίμων (food thickening).

• **Φωσφορικοί μονοεστέρες (DS ~0,25)**

Παραγωγή: ξηρό άμυλο + όξινα άλατα όρθο, πύρο ή τρι φωσφορικά, 60°C. Παρουσιάζουν μείωση Τζ, αυξημένο ιξώδες – διαφάνεια. Σταθερότητα σε ψύξη – απόψυξη.

• **Φωσφορικοί διεστέρες (“cross-linked” starch)**

Παραγωγή: πολτός αμύλου + 2% τριμεταφωσφορικό για 1h στους 50°C. Εμποδίζουν τη διόγκωση κόκκων. Η δημιουργία πλέγματος συνεπάγεται σταθερότητα σε θερμοκρασία, pH, μηχανική ανάδευση. Αυξάνεται το Τζ και προκύπτουν μη διαφανή πηγματα. Εφαρμογές: όταν απαιτείται σταθερότητα σε θέρμανση, ψύξη – απόψυξη.

• **Οξικοί εστέρες (DS ~0,5)**

Παραγωγή: αντίδραση με οξικό ανυδρίτη, 25°C, pH 7-11. Εμποδίζει το συσχετισμό μορίων αμυλόζης και γραμμικών μερών αμυλοπηκτίνης. Παρουσιάζουν μείωση Τζ και αντίσταση σε δημιουργία gel και αναδιαμόρφωση. Δίνουν σταθερά και διαφανή ιξώδη διαλύματα σταθερά σε ψύξη – απόψυξη.

• **Λευκασμένο άμυλο (bleached starch)**

Παραγωγή: αντίδραση με υποχλωρικά άλατα και ήπιος αποπολυμερισμός. Αυξάνει τη λευκότητα για εφαρμογές σαν σκόνη, και όταν χρειάζεται να είναι αποστειρωμένο από σπόρια βακτηρίων όπως π.χ. για προσθήκη σε κονσέρβες.

• **Με υψηλή αμυλόζη (high amylose)**

Δίνουν πολύ ισχυρά, ταχέως σχηματιζόμενα πηγματα (gels). Εφαρμογές: καραμέλες, «κουρκούτια» τηγανίσματος.

• **Δεξτρινιωμένο**

Παράγεται με υδρόλυση μέχρι διαλυτότητας σε κρύο νερό. Δίνουν χαμηλό ιξώδες. Φορέας αφυδατούμενων συστατικών [2].

1.6 ΑΜΥΛΟ ΚΑΙ ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ

Το άμυλο μπορεί να βρεθεί σε δύο τύπους σωματιδίων ανάλογα με το μέγεθός τους: τα μεγάλα και τα μικρά. Το μέγεθός τους συνήθως κυμαίνεται από 1 έως 35μm σε διάμετρο από πηγές όπως κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι και πάνω από 100 μm όταν

προέρχεται από πατάτα. Τα μεγάλα σωματίδια είναι πιο ευαίσθητα σε χημική και ενζυματική υδρόλυση από τα μικρά. Η αναλογία μεταξύ των δυο αυτών τύπων είναι διαφορετική σε διαφορετικά φυτά καθώς και σε διαφορετικές ποικιλίες ενός είδους φυτού. Γενικά, όπου το άμυλο χρησιμοποιείται για υδρόλυση ή ζύμωση (ζυθοποιεία, παραγωγή σιροπιού) η ποικιλία δημητριακών με την υψηλή περιεκτικότητα σε μεγάλα σωματίδια πρέπει να προτιμάται. Εκτός από την χαμηλότερη αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης, τα μη αποδομούμενα μικρά σωματίδια προκαλούν τεχνολογικές επιπλοκές και οικονομικές απώλειες στη ζυθοποιεία.

Το άμυλο από κριθάρι χρησιμοποιείται στη ζυθοποιεία και στην παραγωγή ούισκι. Το πρώτο βήμα στην επεξεργασία του κριθαριού είναι η βυνοποίηση. Η βυνοποίηση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία μια σειρά από βιοχημικές και φυσικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα μέσα στον πυρήνα του κριθαριού. Το ποσοστό στο οποίο αυτές οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα εξαρτάται όχι μόνο από την παραγωγή ικανοποιητικού επιπέδου υδρολυτικών ενζύμων, αλλά επίσης από την ακριβή σύσταση και τη φυσική δομή του πυρήνα του κριθαριού. Έτσι η αποτελεσματικότητα της βυνοποίησης και η ποιότητα της τελικής βύνης βασίζονται σε αυτές τις παραμέτρους οι οποίες αλλάζουν με το είδος του κριθαριού.

Το άμυλο είναι το κύριο συστατικό του κριθαριού ενδοσπερματικά. Γενικά τα μεγάλα σωματίδια αντιπροσωπεύουν μόνο περίπου το 10% του συνολικού αριθμού των υπάρχοντων σωματιδίων, αλλά όμως το 90% του συνολικού βάρους του αμύλου. Εντούτοις, αυτές οι αναλογίες μπορούν να μεταβληθούν σημαντικά σε μερικούς πληθυσμούς αμύλου. Επειδή τα μικρά σωματίδια τείνουν να διεισδύσουν βαθιά στην πρωτεϊνική μήτρα και στο εσωτερικό των κυτταρικών τοιχωμάτων του ενδοσπερμίου, αυτά μπορεί να μεταβάλλουν την υφή του ενδοσπερμίου και να επηρεάσουν το ποσοστό και την έκταση της αλλαγής κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης. Τα μεγάλα σωματίδια αποτελούνται από 25% αμυλόζη και 75% αμυλοπηκτίνη κατά την συγκομιδή, που μειώνονται κατά τη βυνοποίηση με τη δράση της α-αμυλάσης. Τα μικρά σωματίδια έχουν μεγαλύτερη αναλογία αμυλοπηκτίνης που μειώνεται αργά λόγω επιφανειακής διάβρωσης. Εκτεταμένη υδρόλυση της πρωτεϊνικής μήτρας και των κυτταρικών τοιχωμάτων του ενδοσπερμίου μπορεί να είναι επιθυμητή για επίτευξη πλήρους απελευθέρωσης των μικρών σωματιδίων. Αυτή η διαδικασία ίσως να μην μπορεί να ολοκληρωθεί σε βύνη που βρίσκεται στο στάδιο της μετατροπής. Τα μικρά σωματίδια υφίστανται ζελατινοποίηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες και πάνω

από μια τάξη θερμοκρασιών δημιουργούν συσσωματώματα και έτσι είναι λιγότερο επιδεκτικά σε ενζυματική διάσπαση στη θερμοκρασία πολτοποίησης (60-65°C).

Τελικά τα μικρά σωματίδια αμύλου είναι ανεπιθύμητα. Οι δύο τάξεις σωματιδίων αμύλου συμπεριφέρονται διαφορετικά κατά τη βυνοποίηση και την πολτοποίηση. Τελικά, μόνο περίπου τα μισά από τα μικρά σωματίδια διασπώνται, π.χ. το 5% του συνολικού αμύλου δεν διασπάται σε σάκχαρα προς μετατροπής τους με ζύμωση σε αλκοόλη. Τα μικρά σωματίδια αμύλου προκαλούν οικονομικές απώλειες και στη ζυθοποιεία και στα αποστακτήρια. Ο δρόμος προς την εξάλειψη των τεχνολογικών επιλοκών και τη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας τη βυνοποίησης είναι η επιλογή της ποικιλίας κριθαριού που ικανοποιεί τις εξής απαιτήσεις: το χαμηλότερο δυνατό ποσοστό μικρών σωματιδίων και τη μέγιστη δυνατότητα ενζυματικής υδρόλυσης προς απελευθέρωση και εν συνεχεία υδρόλυση του αμύλου από το ενδοσπέρμιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ – ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

ΑΜΥΛΟΥ

2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Η ανάλυση κατανομής μεγέθους σωματιδίων (Particle size distribution - PSD) είναι μια σχετικά καινούρια, σημαντική και ταχέως αναπτυσσόμενη μέθοδος στην αναλυτική χημεία. Το γενικό ενδιαφέρον προέρχεται από το γεγονός ότι ο διαστατικός χαρακτηρισμός μικροσωματιδιακών πολυδισπαρμένων δειγμάτων καθίσταται μια αναπόφευκτη διαδικασία οποτεδήποτε η γνώση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων πολυδισπαρμένων συστημάτων πρόκειται να βελτιωθεί. Είναι ευρέως γνωστό ότι πολλές ιδιότητες πολυδισπαρμένων δειγμάτων είναι στενά συνδεδεμένες με την διαστατική τους κατανομή. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι προσδιορισμού του μεγέθους των σωματιδίων αμύλου είναι οι τεχνικές μικροσκοπίας ακολουθούμενες από ανάλυση ειδώλου και στατιστική εκτίμηση. Εντούτοις, δεν παρέχουν συνεχόμενες τιμές κατανομής, αλλά περισσότερο μια προσέγγιση. Ο όγκος των σωματιδίων αμύλου μπορεί να εκτιμηθεί από σταθερές μεθόδους όπως ο απαριθμητής Coulter. Άλλες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν πρόσφατα και βασίζονται στις ακτίνες laser είναι γρήγορες και αποτελεσματικές σε μια μεγάλη κλίμακα μεγέθους σωματιδίων.

2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ

Από τις αναλυτικές τεχνικές που αναφέρθηκαν πιο πάνω, καμία δεν αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού. Αυτό σημαίνει ότι αν η ανάλυση PSD πρόκειται να εφαρμοσθεί σε πολύπλοκα μίγματα, αυτό μπορεί να προκαλέσει σφάλματα στην PSD ανάλυση διότι τα αποτελέσματα μπορεί να θεωρηθούν σαν μια συσπείρωση κατανομών

διαφορετικών συστατικών. Παρόλα αυτά, η μονοφασική χρωματογραφία πεδίου (ΜΧΠ) ανήκει στην οικογένεια των τεχνικών διαχωρισμού και έχει δειχθεί ότι είναι μια ικανή μέθοδος διαχωρισμού και χαρακτηρισμού πολυδισπαρμένων δειγμάτων διαφορετικής προέλευσης. Συνεπώς, η ΜΧΠ είναι ικανή να παρέχει μια ακριβή PSD ανάλυση ακόμα και σε πολύ πολύπλοκα δείγματα, λόγω της υψηλής της ικανότητας ανάλυσης.

Η ΜΧΠ έχει προταθεί σαν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό και τον διαχωρισμό των σωματιδίων αμύλου. Έχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως ταυτόχρονος διαχωρισμός και μέτρηση-χαρακτηρισμός, πολλαπλή χρησιμότητα, καλή συμβατότητα με διαλύτες, σχετικά απλός συνδυασμός με μια ποικιλία ανιχνευτών.

Τα διαχωρισμένα κλάσματα που λαμβάνουμε με τη ΜΧΠ μπορούν να αναλυθούν στη συνέχεια με άλλες οργανολογίες με τις οποίες συμπληρωματικές μετρήσεις οδηγούν σε μία σφαιρική εικόνα των ιδιοτήτων των αναλυόμενων σωματιδίων, όπως φαίνεται στο Σχ. 2.1 [4-8]. Αυτές οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν με χρήση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης, με Φασματοσκοπία Συσχέτισης Φωτονίου, με Κλασική Σκέδαση Φωτός, με Σκέδαση ακτινών Laser, με Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICPMS), ή με μια άλλη επιμέρους τεχνική της ΜΧΠ και να οδηγήσουν στην εξαγωγή φυσικών σταθερών ή στην κατανόηση της χημικής σύστασης των σωματιδίων του δείγματος [5]. Οι ιδιότητες που μπορούν να μετρηθούν με αυτές τις τεχνικές, όταν συνδυάζονται με κατάλληλες μετρήσεις με τη ΜΧΠ, εμπλουτίζουν τις πληροφορίες για το χαρακτηρισμό του δείγματος και των συστατικών του. Έτσι, νέες δυνατότητες εμφανίζονται για το χαρακτηρισμό σύνθετων κολλοειδών συστημάτων περιβαλλοντικής, βιολογικής ή βιομηχανικής προέλευσης.

Άλλες διαχωριστικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση ιδιοτήτων μακρομορίων και σωματιδίων, αλλά το εύρος τους είναι πιο περιορισμένο παρέχοντας πληροφορίες το πολύ για μία ιδιότητα. Για παράδειγμα, η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (ΧΑΜ) παρέχει την υδροδυναμική διάμετρο του πολυμερούς [9], αλλά η μέτρηση απαιτεί βαθμολόγηση του οργάνου με πρότυπα δείγματα, βασίζεται στην υπόθεση ότι η υδροδυναμική διάμετρος σχετίζεται με το χρόνο συγκράτησης και όχι σε κάποια θεωρία, και δεν μπορεί να επεκταθεί σε πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος ή σε τυπικά κολλοειδή.

Βασικές Ιδιότητες



Δευτερεύουσες Ιδιότητες

Σχήμα 2.1: Βασικές και δευτερεύουσες ιδιότητες κολλοειδών και μακρομορίων που μπορούν να μετρηθούν με τη ΜΧΠ.

Σε αντίθεση με τη ΧΑΜ, η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (ΥΧΥΑ) (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) δίνει το συντελεστή διασποράς K , ο οποίος παρέχει πληροφορίες για τη σχετική υδροφοβία, την πολικότητα και τις σχετιζόμενες ιδιότητες. Εντούτοις, οι τιμές του K , οι οποίες προκύπτουν από την αμοιβαία αλληλεπίδραση της διαλυμένης ουσίας και της ακίνητης φάσης, είναι δύσκολο να μεταφραστούν σε πραγματικές φυσικοχημικές σταθερές αποκλειστικά της διαλυμένης ουσίας.

Η Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς (ΗΤ) μπορεί να παρέχει ηλεκτροφορητικές ευκινησίες αν η ηλεκτροωσμωτική ροή αποδοθεί σωστά [10]. Η ευκινησία, μία χρήσιμη παράμετρος, είναι στην πραγματικότητα μία σύνθεση περισσότερο βασικών παραμέτρων: του αποτελεσματικού φορτίου και του συντελεστή τριβής [11]. Οι τιμές της ευκινησίας δεν μπορούν να αναλυθούν σε αυτές τις βασικές σταθερές χωρίς συμπληρωματικές μετρήσεις.

Η ΜΧΠ, παρ' όλα αυτά, είναι ικανή να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης περιοχής ιδιοτήτων, που όλες βασίζονται σε απλές θεωρητικές αρχές. Εύκολα συνδυάζεται με άλλες τεχνικές και μπορεί να εφαρμοστεί για τη δύσκολη αλλά αυξανόμενης σπουδαιότητας περιοχή των μεγάλων πολυμερών, των μικροτζέλ, απλών και σύνθετων κολλοειδών συστημάτων, και να διαχωρίσει σωματίδια μεγέθους από 0,1 μm έως 100 μm. Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί σε τέτοιου είδους μετρήσεις με τη χρήση της ΜΧΠ [12,13].

2.3 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΠΕΔΙΟΥ

Η Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου (ΜΧΠ) καλείται επίσης και χρωματογραφία μιας φάσης [14,15] ή, ακόμα, χρωματογραφία πόλωσης [16] καθώς ο διαχωρισμός γίνεται σε έναν αγωγό ρευστού που περιέχει μόνο μία φάση, σχεδόν αποκλειστικά μια υγρή φάση, αν και η χρήση μιας αέριας φάσης έχει αναφερθεί [17] ενώ έχουν γίνει προσπάθειες και για διαχωρισμό με χρήση μιας υπερκρίσιμης ρευστής φάσης [18,19]. Μία σταθερή ροή αυτής της υγρής φάσης επιτρέπει τη μεταφορά των συστατικών του δείγματος κατά μήκος της στήλης διαχωρισμού. Όλες οι επιμέρους τεχνικές της ΜΧΠ χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι μία δύναμη εφαρμόζεται στα μόρια ή τα σωματίδια των συστατικών του δείγματος σε κατεύθυνση κάθετη ως προς τη διεύθυνση κίνησης της ροής. Μία τέτοια δύναμη προκύπτει από ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο, λόγος για τον οποίο δόθηκε η ονομασία Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου αρχικά από τον Giddings [17], αλλά μπορεί επίσης να προέλθει και από μία κάθετη ροή ή τις υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις των μορίων ή των σωματιδίων με τη ροή.

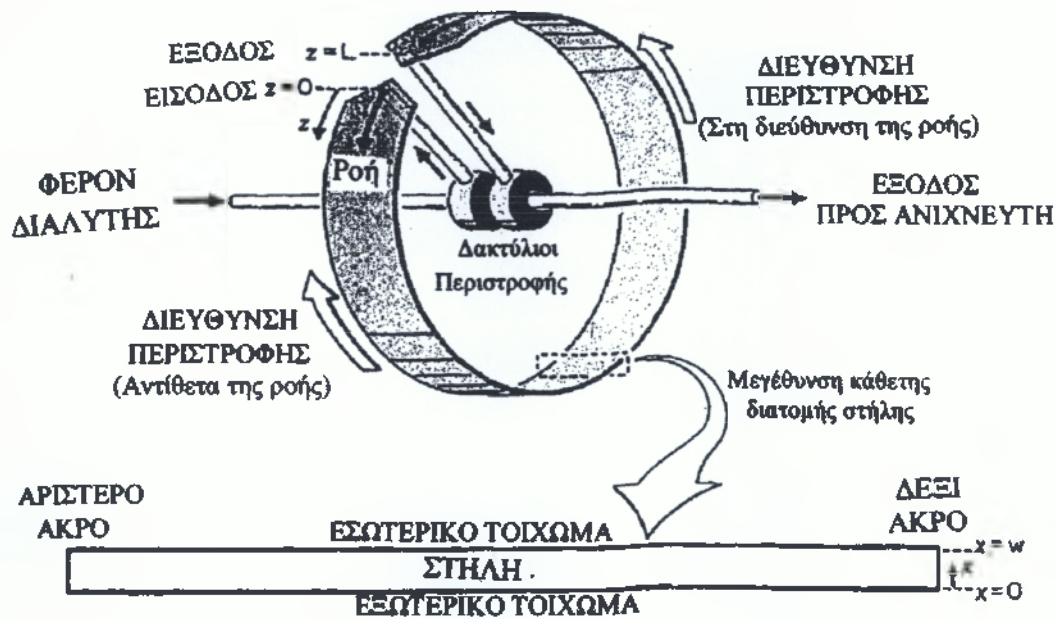
Αν και η επίτευξη ενός διαχωρισμού με τη ΜΧΠ μπορεί να προκληθεί με διάφορες μεθόδους, η μέθοδος της ανάπτυξης ζωνών έκλουσης είναι η πιο ευρέως εφαρμοζόμενη, με εξαίρεση μία αναφορά για μετωπική ανάλυση με τη ΜΧΠ [20]. Μία μικρή ποσότητα δείγματος εισάγεται στην είσοδο της χρωματογραφικής στήλης, διάφορες ζώνες ανάλυσης αναπτύσσονται εντός της στήλης καθώς τα διάφορα συστατικά μεταφέρονται με διαφορετικό τρόπο από τη ροή του φέροντος διαλύτη και διαφορετικοί χρόνοι έκλουσης αυτών των ζωνών παρατηρούνται από έναν κατάλληλο ανιχνευτή συνδεδεμένο στην έξοδο της στήλης. Το χρωματογράφημα, που είναι η

καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή έναντι του χρόνου από την είσοδο του δείγματος στη στήλη, εμφανίζεται ως η επίτευξη περισσότερο ή λιγότερο συμμετρικών ζωνών ή ως ένα σύνολο ατελώς διαχωρισμένων ζωνών.

Η ΜΧΠ είναι κυρίως μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό ενός πλήθους φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως η μάζα και το μοριακό βάρος των αναλυόμενων σωματιδίων, η πυκνότητα, η διάμετρος, το επιφανειακό φορτίο, ο συντελεστής διάχυσης και ο συντελεστής θερμικής διάχυσης. Μέχρι τώρα έχει εφαρμοστεί σε μία μεγάλη κλίμακα μακρομορίων, κολλοειδών και δειγμάτων ιδιαίτερης βιομηχανικής και περιβαλλοντικής αξίας καθώς επίσης και σε βιοϊατρικά και βιολογικά δείγματα [21].

2.4 ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

Στην περίπτωση της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Φυγοκεντρικού Πεδίου (ΜΧΦΠ) μία δύναμη πολλαπλάσια της βαρύτητας ελευθερώνεται με τη χρήση μιας φυγοκέντρου. Τότε, η στήλη δεν έχει μια επίπεδη γεωμετρία, όπως συμβαίνει στις περισσότερες από τις άλλες επιμέρους τεχνικές της ΜΧΠ, αλλά είναι καμπυλωμένη εντός ενός καλαθιού μιας φυγοκέντρου με μία σταθερή ακτίνα περιστροφής, π.χ. σε μία σταθερή απόσταση από το άξονα περιστροφής, όπως φαίνεται στο Σχ. 2.2. Η δύναμη του πεδίου που ασκείται στα σωματίδια του δείγματος είναι, σε όλες τις θέσεις εντός της στήλης, απευθείας κάθετη στις συντεταγμένες της ροής.



Σχήμα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος ΜΧΦΠ

Η φυγοκεντρική δύναμη, F_f , που εφαρμόζεται σε ένα σωματίδιο δίνεται, σύμφωνα με το νόμο του Newton, από τη σχέση

$$F_f = m_{eff} G \quad (2.1)$$

ή αλλιώς

$$F_f = v_p \Delta\rho G \quad (2.2)$$

με

$$\Delta\rho = \rho_p - \rho_l \quad (2.3)$$

όπου ρ_p και ρ_l είναι αντίστοιχα οι πυκνότητες των σωματιδίων και του φέροντος διαλύτη, $\Delta\rho$ η διαφορά πυκνότητας μεταξύ σωματιδίων και διαλύτη, G η επιτάχυνση της φυγοκέντρου και m_{eff} η αποτελεσματική μάζα ενός σωματιδίου του δείγματος η οποία σχετίζεται με την πραγματική μάζα του σωματιδίου, m , ως

$$m_{eff} = m \frac{\Delta\rho}{\rho_p} \quad (2.4)$$

Αν R_{acc} η ακτίνα καμπυλότητας του τοιχώματος συσσώρευσης του δείγματος, (εσωτερικό ή εξωτερικό τοίχωμα όταν $\Delta\rho < 0$ ή $\Delta\rho > 0$, αντίστοιχα) και Ω η γωνιακή ταχύτητα περιστροφής, το G δίνεται ως

$$G = \Omega^2 R_{acc} \quad (2.5)$$

με

$$\Omega = \frac{2\pi rpm}{60} \quad (2.6)$$

και rpm ο αριθμός των περιστροφών ανά λεπτό. Έτσι, η θεμελιώδης παράμετρος λ στη ΜΧΦΠ θα δίνεται από τη σχέση

$$\lambda = \frac{kT}{m_{eff} G w} \quad (2.7\alpha)$$

ή

$$\lambda = \frac{kT}{v_p \Delta\rho G w} \quad (2.7\beta)$$

ή ακόμα

$$\lambda = \frac{6kT}{\pi d_v^3 \Delta\rho G w} \quad (2.7\gamma)$$

όπου d_v η διάμετρος ισοδύναμου όγκου του σωματιδίου, δηλαδή η διάμετρος μίας σφαίρας που έχει τον ίδιο όγκο v_p με το σωματίδιο, και η οποία δίνεται από τη σχέση

$$d_v = \left(\frac{6v_p}{\pi} \right)^{1/3} \quad (2.8)$$

Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι, σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο συγκράτησης, η ΜΧΦΠ επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό της αποτελεσματικής μάζας των σωματιδίων όταν οι πειραματικές συνθήκες λειτουργίας T , G και w είναι καθορισμένες. Αν η $\Delta\rho$ είναι γνωστή, ο όγκος του σωματιδίου, και κατ' επέκταση η διάμετρος ισοδύναμου όγκου, μπορούν να προσδιοριστούν.

2.5 ΣΤΕΡΙΚΗ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΔΙΟΥ

Όταν σφαιρικά σωματίδια μικρού μεγέθους αναλύονται κάτω από σταθερή ισχύ πεδίου, π.χ. με τη ΜΧΦΠ, ο χρόνος έκλουσης αυξάνει με το μέγεθος των σωματιδίων. Πράγματι, το λ μειώνεται με την αύξηση του d και το ίδιο κάνει και το R , το οποίο είναι μια μονότονη συνάρτηση του λ . Εντούτοις, καθώς το μέγεθος του σωματιδίου αυξάνει, η θεώρηση των σωματιδίων ως σημειακών μαζών καθίσταται εσφαλμένη και ο στερικός παράγοντας άπωσης των σωματιδίων από το τοίχωμα συσσώρευσης λόγω του μεγέθους τους θα πρέπει να ληφθεί υπόψη. Αυτός ο παράγοντας οδηγεί σε τροποποίηση της έκφρασης του λόγου συγκράτησης και σε ταχύτερες υψηλότερες από την αναμενόμενη, αν θεωρούσαμε τα σωματίδια σημειακές μάζες. Τότε, ο λόγος συγκράτησης R αυξάνει με το μέγεθος του σωματιδίου. Υπάρχει μία κρίσιμη διάμετρος σωματιδίου, d_{mv} , πάνω από την οποία παρατηρείται αυτή η εναλλαγή των φαινομένων και η οποία εξαρτάται από την ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου [22-25].

Για σωματίδια με διαμέτρους μεγαλύτερες από την d_{mv} ο λόγος συγκράτησης αυξάνει με τη διάμετρο [26]. Επειδή η εξάρτηση της συγκράτησης από το μέγεθος του σωματιδίου μετά το κρίσιμο σημείο διαφέρει δραστικά από ότι στην κατάσταση λειτουργίας Brown, και επειδή υπάρχει μία ποιοτική συμφωνία με τη συγκράτηση λόγω στερικών φαινομένων, αυτή η κατάσταση λειτουργίας ονομάζεται *στερική κατάσταση λειτουργίας*. Η Μονοφασική Χρωματογραφία Βαρυτικού Πεδίου-ΜΧΒΠ- (η εκδοχή της ΜΧΦΠ όταν η εφαρμοζόμενη δύναμη ισούται με μία βαρύτητα) βρέθηκε ότι είναι σε λογική ποιοτική συμφωνία με το μοντέλο της στερικής κατάστασης λειτουργίας [27].

Ο υπολογισμός της δύναμης ανύψωσης που δρα σε ένα σφαιρικό σωματίδιο είναι ένα σύνθετο πρόβλημα δυναμικής ρευστών το οποίο δεν έχει επιλυθεί πλήρως σε συνθήκες λειτουργίας του συστήματος της ΜΧΠ. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχει κανένα εντελώς ικανοποιητικό μοντέλο λειτουργίας για τη συμπεριφορά της ΜΧΠ στη στερική περιοχή. Ωστόσο, η δύναμη ανύψωσης φαίνεται να είναι εκθετικά ανάλογη της διαμέτρου του σωματιδίου ($F_f \propto d^3$ στη ΜΧΦΠ) και ανάλογη με το τετράγωνο της μέσης ταχύτητας ροής, γεγονός που εξηγεί γιατί αυτή η δύναμη γίνεται σημαντική μόνο για σχετικά μεγάλα σωματίδια και σχετικά υψηλές ροές [28-32]. Εξαρτάται επίσης από τη θέση του σωματιδίου στο εσωτερικό της στήλης της ΜΧΠ [33]. Η δράση της δύναμης ανύψωσης έχει ως αποτέλεσμα ο λόγος συγκράτησης των

σωματιδίων να αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους, και κατά συνέπεια τα μεγαλύτερα σωματίδια να εκλούνται πρώτα. Τέλος, ο λόγος συγκράτησης αυξάνει με την αύξηση της ροής και με τη μείωση της ισχύος του πεδίου, όπως φαίνεται από μεγάλο αριθμό πειραματικών παρατηρήσεων [34,35].

$$\lim_{\alpha, \lambda \rightarrow 0} R_{ste} = 6\alpha + 6\lambda \quad (2.9)$$

Στην περίπτωση αυτή ο λόγος συγκράτησης θα δίνεται από την Εξ. (2.9), το όριο της οποίας οδηγεί στη σχέση [36]

$$R = 6\gamma_{corr} \frac{d}{2w} \quad (2.10)$$

όπου ο συντελεστής γ_{corr} είναι παράγοντας διόρθωσης, σχετίζεται με την ελάττωση της ταχύτητας των σωματιδίων λόγω της καταναλισκόμενης περιστροφικής ενέργειας και έχει τιμή μικρότερη της μονάδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΜΥΛΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΥΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

Η επιθυμητή καμπύλη κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων είναι ένα γράφημα της πραγματικής συγκέντρωσης σωματιδίων έναντι της διαμέτρου των σωματιδίων. Για τη μετατροπή ενός τυπικού χρωματογραφήματος που λαμβάνουμε με την ΜΧΦΠ σε ένα δείγμα καμπύλης κατανομής μεγέθους σωματιδίων πρέπει να γίνουν οι επόμενες δύο διορθώσεις:

α) Εφόσον η απόκριση του ανιχνευτή είναι μια συνάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων καθώς και της συγκέντρωσης αυτών, το χρωματογράφημα πρέπει να διορθωθεί προκειμένου να εξαλειφθεί η επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων.

β) Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής απορρόφησης *UV*, ο οποίος δρα ως θολοσίμετρο, και ο οποίος υπόκειται σε μία δεύτερη διόρθωση για την απαλοιφή της εξάρτησης του μεγέθους από το σήμα που προκύπτει από τη σκέδαση του φωτός.

Τα δεδομένα για τη σκέδαση του φωτός για το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι διαθέσιμα και έτσι η δεύτερη διόρθωση δεν μπορεί να γίνει. Εντούτοις, όταν και οι δύο διορθώσεις εφαρμόστηκαν στο παρελθόν [37,38], η τελική καμπύλη κατανομής του μεγέθους που λήφθηκε ήταν σχεδόν ταυτόσημη με την αρχική μη διορθωμένη καμπύλη. Αυτές οι δύο διορθώσεις σε μεγάλο βαθμό αντισταθμίζουν η μία την άλλη, καθιστώντας έτσι δυνατή τη χρήση των μη διορθωμένων καμπυλών ως αληθών καμπυλών κατανομής μεγέθους σωματιδίων.

Στο Σχ. 3.1 φαίνονται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με την τεχνική της ΜΧΦΠ για δείγματα αμύλου προερχόμενα από διάφορες πηγές, καθώς και οι αντίστοιχες φωτογραφίες που ελήφθησαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Όταν η πηγή προέλευσης ήταν κριθάρι (Σχ. 3.1α) το δείγμα εμφάνιζε μια τριωνυμική κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του. Στο Σχ. 3.1β φαίνεται το

χρωματογράφημα για δείγμα αμύλου από σιτάρι όπου εμφανίζεται μία δυνωμική κατανομή μεγέθους σωματιδίων, η οποία είναι αποδεκτή στη βιβλιογραφία [39-41].

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι μια μεγάλη ποικιλία βιβλίων που αφορούν μελέτες σχετικές με άμυλο [42,43] αναφέρουν επίσης την πιθανότητα μιας τριωνυμικής κατανομής μεγέθους για τα σωματίδια αμύλου από σιτάρι. Στην περίπτωση του Σχ. 3.1γ, το οποίο αντιστοιχεί σε δείγμα αμύλου προερχόμενο από καλαμπόκι, εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, που αντιστοιχεί σε μία μόνο κατανομή μεγέθους για τα σωματίδια του δείγματος αμύλου από καλαμπόκι που χρησιμοποιήθηκε. Συνεπώς, η διαφοροποίηση στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του αμύλου ανάλογα με την πηγή προέλευσής του, δεν μπορεί να οφείλεται σε φαινόμενα διαλυτοποίησης ή συσσωμάτωσης των σωματιδίων του αμύλου. Η ύπαρξη μιας μόνο κορυφής έκλουσης στην περίπτωση του δείγματος αμύλου από καλαμπόκι, πιθανότατα οφείλεται στην ευρεία διασπορά του μεγέθους των σωματιδίων του.

Η καμπύλη έκλουσης (Σχ.3.1β) διαιρείται σε περιοχές στις οποίες η διάμετρος των σωματιδίων, d_i , η οποία ανταποκρίνεται στον όγκο συγκράτησης, V_{ri} , θεωρείται σταθερή σε όλο το διάστημα και η τιμή της δίνεται από το μέσο αυτού. Η διαδικασία διαίρεσης για κάθε κορυφή στο χρωματογράφημα γίνεται με την χρήση της «φέρουσα την κάθετο» μεθόδου [44], μη συμπεριλαμβανομένου του νεκρού όγκου. Οι τιμές των διαμέτρων υπολογίζονται με χρήση της μεθόδου διόρθωσης πυκνοτήτων που περιγράψαμε προηγουμένως. Το σχεδιάγραμμα που χρησιμοποιείται υπακούει στην πρότυπη καμπύλη. Από όλες τις τιμές d_i ενός χρωματογραφήματος υπολογίζουμε τη μέση μαζική, d_w , και τη μέση αριθμητική, d_N , διάμετρο καθώς και τις σταθερές αποκλίσεις αυτών σ_{d_w} και σ_{d_N} , αντίστοιχα.

Από όλες τις τιμές των d_i , του χρωματογραφήματος, η μέση αριθμητική διάμετρος των σωματιδίων, d_N , υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης [45]:

$$d_N = \frac{\sum_i d_i n_i}{\sum_i n_i} = \frac{\sum_i w_i}{\sum_i \frac{w_i}{d_i}} \quad (3.1)$$

όπου n_i ο αριθμός των σωματιδίων που έχουν σταθερή διάμετρο d_i , και w_i , το βάρος των n_i σωματιδίων το οποίο είναι ανάλογο του αντίστοιχου στοιχειώδους εμβαδού του χρωματογραφήματος.

Η σταθερή απόκλιση της μέσης αριθμητικής διαμέτρου των σωματιδίων, σ_{d_N} , υπολογίστηκε από την εξίσωση [45]:

$$\sigma_{d_N} = \left[\frac{\sum_i (d_i - d_N)^2 n_i}{\sum_i n_i - 1} \right]^{1/2} \quad (3.2)$$

Η μέση μαζική διάμετρος των σωματιδίων, d_w , καθώς και η σταθερή απόκλιση αυτής σ_{d_w} , υπολογίζονται από τις σχέσεις:

$$d_w = \frac{\sum_i d_i^4 n_i}{\sum_i d_i^3 n_i} = \frac{\sum_i d_i w_i}{\sum_i w_i} \quad (3.3)$$

$$\sigma_{d_w} = \left[\frac{\sum_i (d_i - d_w)^2 w_i}{\sum_i w_i} \right]^{1/2} \quad (3.4)$$

Η πειραματική μας μελέτη εστιάζεται στη μεταβολή της μέσης αριθμητικής και μέσης μαζικής διαμέτρου σωματιδίων αμύλου προερχόμενα από κριθάρι με τη μεταβολή των εφαρμοζόμενων πειραματικών συνθηκών.

Οι τιμές των μέσων αριθμητικών και μέσων μαζικών διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου ανάλογα με την πηγή προέλευσης αυτού, δίνονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τόσο τις μέσες αριθμητικές, όσο και τις μέσες μαζικές διαμέτρους των σωματιδίων αμύλου που δίνονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2 με τις αντίστοιχες μέσες τιμές των διαμέτρων που υπολογίστηκαν από το SEM, παρατηρούμε ότι βρίσκονται σε πολύ καλή συμφωνία μεταξύ τους, γεγονός που καθιστά τη ΜΧΦΠ ως μια αξιόπιστη τεχνική για την ανάλυση και το χαρακτηρισμό σωματιδίων αμύλου προερχόμενο από διάφορα δημητριακά.

Εκτός από τα μεγέθη d_N και d_w που υπολογίστηκαν, υπάρχουν και δύο άλλοι τρόποι για να παρουσιαστεί η περιγραφή ενός πολυδιασπαρμένου συστήματος, όπως το δείγμα αμύλου, σε σχέση με τις τιμές διαμέτρου d_i σε κάθε χρωματογράφημα που υπολογίσαμε με την μέθοδο που περιγράψαμε πριν.

Πίνακας 3.1: Μέσες αριθμητικές διαμέτροι, d_N , και οι σταθερές αποκλίσεις αυτών, σ_{d_N} , για τα μεγάλα, τα μεσαία και τα μικρά σωματίδια αμύλου προερχόμενο από διάφορα δημητριακά.

Πηγή Προέλευσης	$d_N \pm \sigma_{d_N}$			SEM		
	Μεγάλα	Μεσαία	Μικρά	Μεγάλα	Μεσαία	Μικρά
Κριθάρι	18,3±3,2	9,9±1,7	6,7±0,3	19,8±2,1	13,0±1,9	3,7±0,9
Σιτάρι	13,8±3,6	-	6,0±0,8	18,0±5,1	-	4,8±0,9
Καλαμπόκι	19,17±4,3	-	-	21,3±3,8	-	-

Πίνακας 3.2: Μέσες μαζικές διαμέτροι, d_w , και οι σταθερές αποκλίσεις αυτών, σ_{d_w} , για τα μεγάλα, τα μεσαία και τα μικρά σωματίδια αμύλου προερχόμενο από διάφορα δημητριακά.

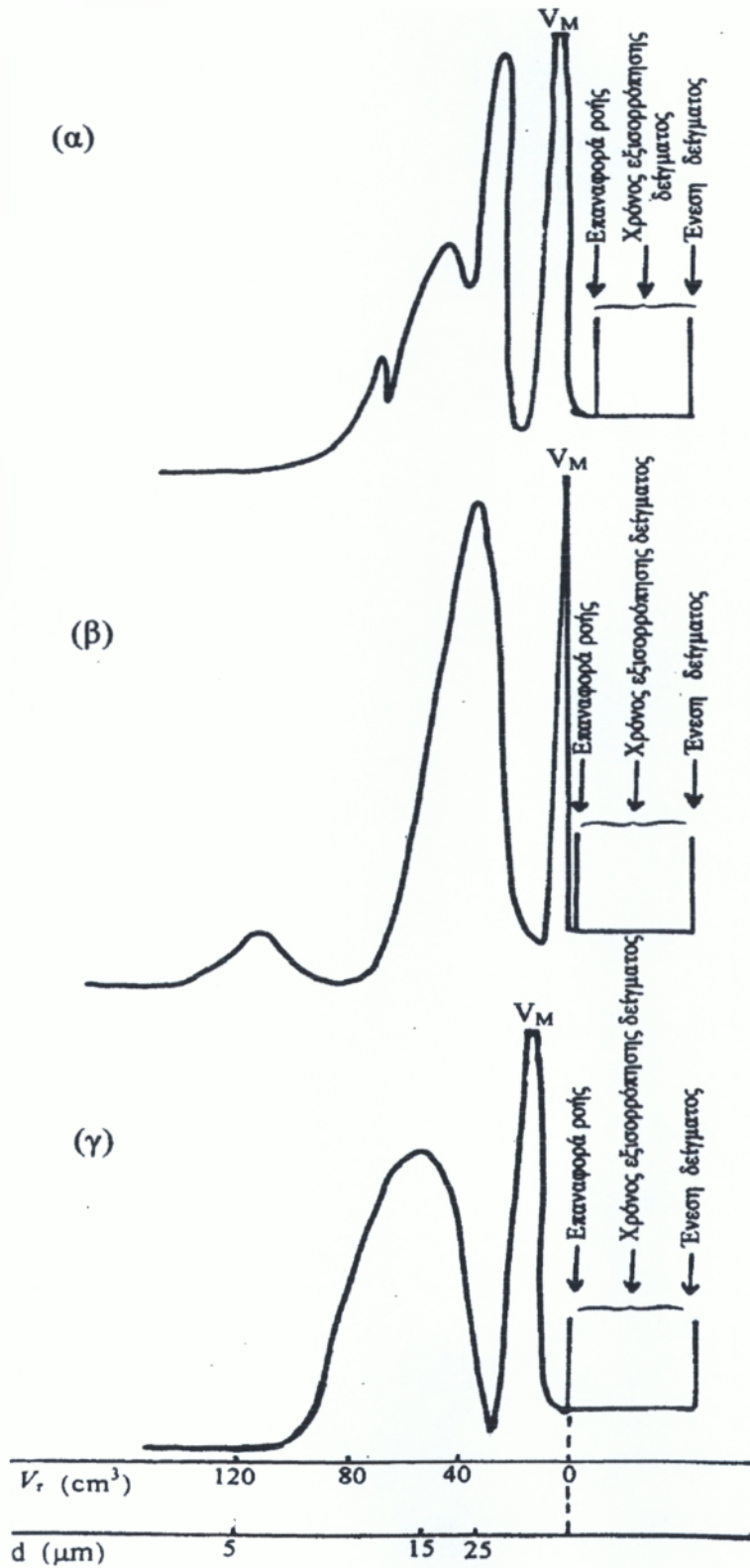
Πηγή Προέλευσης	$d_w \pm \sigma_{d_w}$		
	Μεγάλα	Μεσαία	Μικρά
Κριθάρι	18,3±3,2	9,9±1,7	6,7±0,3
Σιτάρι	13,8±3,6	-	6,0±0,8
Καλαμπόκι	19,17±4,3	-	-

Μια συνήθης γραφική απεικόνιση της συχνότητας κατανομής είναι το ιστόγραμμα, ένα γράφημα με κάθετες στήλες στο οποίο οι διαμέτροι, d_i , αποτελούν την βάση, ενώ το ύψος της στήλης του είναι ανάλογο με τον αριθμό των σωματιδίων με σταθερή διάμετρο d_i . Η τελευταία είναι ανάλογη με το εμβαδόν του σκιασμένου

τμήματος του χρωματογραφήματος (Σχ. 3.1β), μόνο στην περίπτωση όπου το μέγεθος των σωματιδίων παραμένει σταθερό. Η τεταγμένη καθορίζεται ως το κλάσμα των σωματιδίων, n_i , με σταθερή διάμετρο, d_i , που εκλούνται στο σκιασμένο τμήμα το οποίο είναι ανάλογο με το κλάσμα του εμβαδού του σκιασμένου τμήματος, f_i . Στα Σχ. 3.2α και 3.2β δίνονται τα ιστογράμματα που λαμβάνονται με την τεχνική της ΜΧΦΠ και της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης, αντίστοιχα, για τα δείγματα αμύλου από σιτάρι.

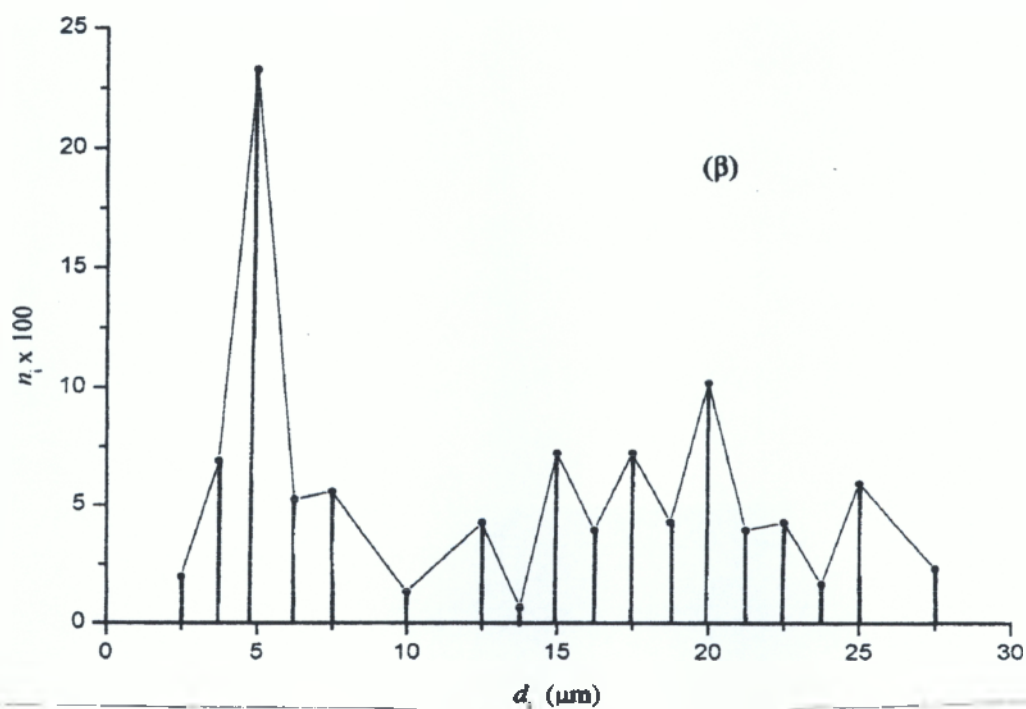
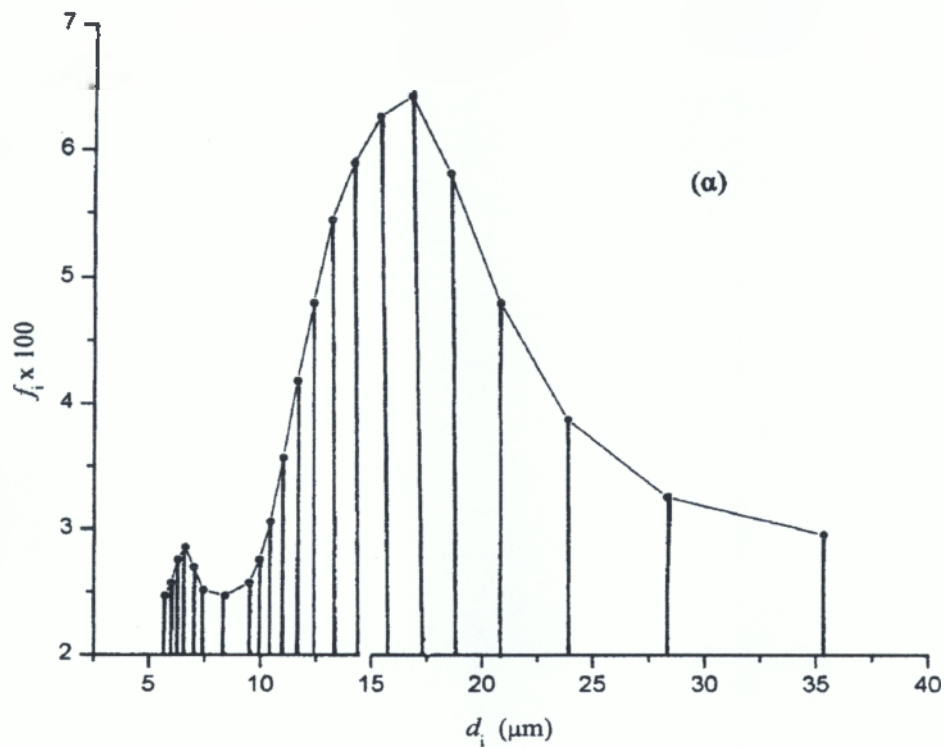
Αυτά τα είδη δεδομένων μπορούν επίσης να παρασταθούν ως μία αθροιστική καμπύλη στην οποία τα κλάσματα των σωματιδίων, $n_{T,i}$ (ή το αντίστοιχο κλάσμα του εμβαδού, $f_{T,i}$) που έχουν διαμέτρους μικρότερες μέχρι και τη συγκεκριμένη διάμετρο, d_i , σχεδιάζονται έναντι της διαμέτρου d_i . Στα Σχ. 3.3α και 3.3β φαίνονται οι αθροιστικές καμπύλες για τα ίδια δεδομένα που φαίνονται στα Σχ. 3.2α και 3.2β, αντίστοιχα.

Η ομοιότητα που εμφανίζουν μεταξύ τους τόσο τα Σχ. 3.2α και 3.2β όσο και τα Σχ. 3.3α και 3.3β ισχυροποιούν το επιχείρημα περί αυξημένης ικανότητας της τεχνικής της ΜΧΦΠ για ανάλυση και χαρακτηρισμό σωματιδίων αμύλου. Ο αντικειμενικός σκοπός της παρούσας εργασίας, μεταξύ άλλων, είναι η μελέτη της επίδρασης του pH και της ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς τόσο στη μεταβολή της κατανομής του μεγέθους, όσο και στη μεταβολή της κατανομής των μαζών των σωματιδίων του αμύλου. Λόγω του ότι το δείγμα αμύλου από καλαμπόκι που αναλύθηκε εμφάνισε μία κορυφή έκλυσης, που σημαίνει μία κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του, δεν μπορεί να μελετηθεί η επίδραση των πιο πάνω πειραματικών μεταβλητών στη μεταβολή της κατανομής του μεγέθους και της κατανομής των μαζών των σωματιδίων αμύλου από καλαμπόκι.

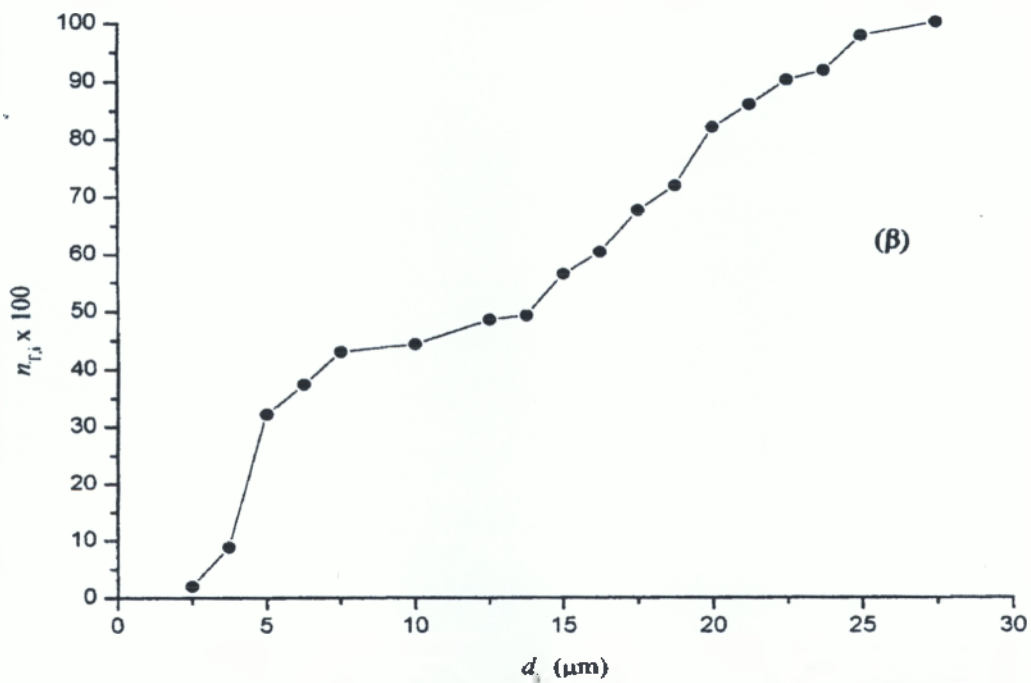
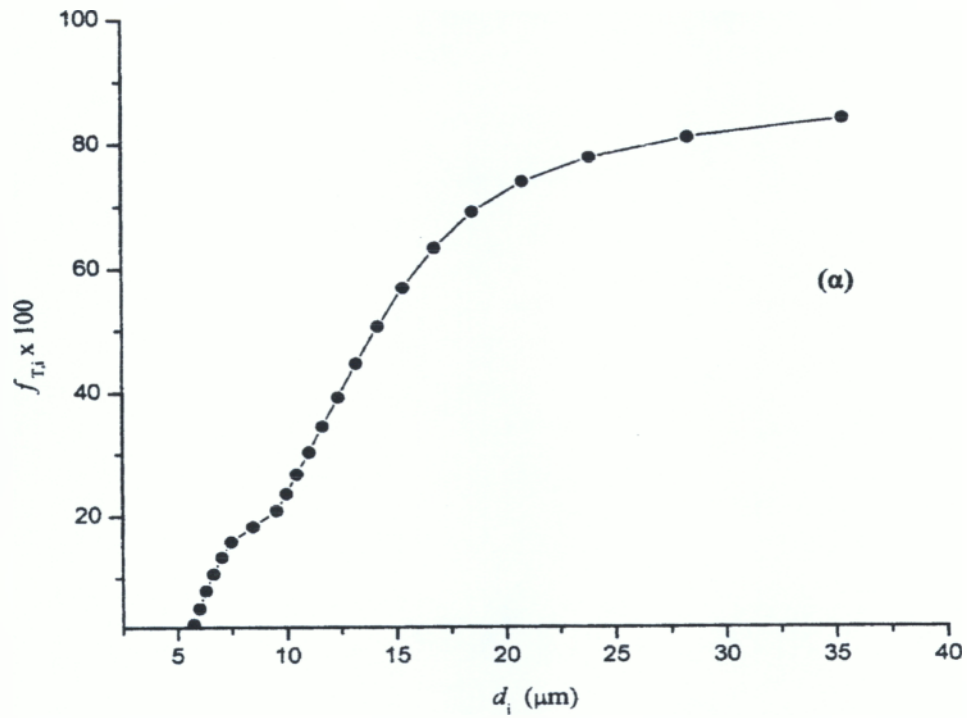


Χρωματογραφικό σήμα υποβιβασμένο κατά 0,02

Σχήμα 3.1: Χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με την τεχνική της ΜΧΦΠ, για δείγματα αμύλου διαφορετικής πηγής προέλευσης. α) άμυλο από κριθάρι, β) άμυλο από σιτάρι και γ) άμυλο από καλαμπόκι



Σχήμα 3.2: Γραφική απεικόνιση ως ιστόγραμμα των διαμέτρων των σωματιδίων αμόλου από σιτάρι που ελήφθησαν: (α) με την τεχνική της ΜΧΦΠ και (β) με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).



Σχήμα 3.3: Αθροιστικές καμπύλες κατανομής των διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι που ελήφθησαν: (α) με την τεχνική της ΜΧΦΠ και (β) με τη χρήση SEM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ pH ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ

Η ολική δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης, $V(h)$, εξαρτάται από την ενέργεια αλληλεπιδράσεως των σωματιδίων με το τοίχωμα της στήλης, $V_{DL}(h)$, η οποία είναι συνάρτηση του επιφανειακού δυναμικού των σωματιδίων και το οποίο δίνεται από τη σχέση

$$\psi = \frac{kT}{2,303e} (pH_{zpc} - pH) \quad (4.1)$$

όπου pH_{zpc} είναι το pH όπου το ολικό φορτίο της επιφάνειας είναι μηδέν. Από την Εξ. 4.1 διαπιστώνουμε ότι η ολική ενέργεια αλληλεπίδρασης εξαρτάται από το pH του μέσου διασποράς. Ο φέρον διαλύτης που χρησιμοποιούμε περιέχει 0,5 % FL-70 που αντιστοιχεί σε ιοντική ισχύ ίση με 10^{-3} [46]. Μπορούμε, μετά από αυτό, να θεωρήσουμε ότι με τη μεταβολή του pH η ιοντική ισχύς του μέσου παραμένει σταθερή και κατά συνέπεια οποιαδήποτε μεταβολή στο μέγεθος των σωματιδίων του αμύλου θα οφείλεται σε φαινόμενα που προκύπτουν από τη μεταβολή του pH και μόνο.

Στο Σχ. 4.1 παρίστανται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ΜΧΦΠ για τα σωματίδια αμύλου από σιτάρι, διεσπαρμένο σε διάφορα μέσα, που έχουν διαφορετικές τιμές pH, καθώς και οι αντίστοιχες φωτογραφίες SEM. Αυτό δείχνει ότι η μορφή του χρωματογραφήματος και των φωτογραφιών SEM είναι ανεξάρτητα από το pH του μέσου διασποράς, άρα στα σωματίδια αμύλου από σιτάρι δεν παρατηρούνται φαινόμενα διάλυσης και συσσωμάτωσης. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, μελετήθηκε η μεταβολή των μέσων αριθμητικών και μέσων μαζικών διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου που προσδιορίστηκαν από την ΜΧΦΠ με το pH του μέσου διασποράς.

Στο Σχ. 4.2 φαίνεται η μεταβολή του δυναμικού ζ των σωματιδίων αμύλου σε σχέση με το pH του μέσου διασποράς για σταθερή ιοντική ισχύ. Τα σωματίδια αμύλου φέρουν και λιπίδια και πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους. Τα λιπίδια περιέχουν τόσο φωσφορικούς εστέρες όσο και τεταρτοταγή αμινομάδες, ενώ ελεύθερα λιπαρά

οξέα συνεισφέρουν υδροξυλομάδες με $pK_a \cong 4$. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια του σωματιδίου του αμύλου είναι αρκετά βασικές με $pK_a > 10$ [47]. Η μεταβολή του δυναμικού ζ συναρτήσεως του pH για το δείγμα αμύλου οφείλεται στην παρουσία τόσο θετικά όσο και αρνητικά φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια των σωματιδίων. Το αρνητικό δυναμικό ζ στην περιοχή pH 2,5-12 επιβεβαιώνει την ανιονική συμπεριφορά του αμύλου. Είναι φανερό ότι το ισοηλεκτρικό σημείο ($pH_{i.e.p} = 2,5$) είναι έξω από την περιοχή του pH που δουλέψαμε. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η επίδραση της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων του διαλύματος στο δυναμικό ζ των σωματιδίων αμύλου, δεν είναι πολύ μεγάλη στην περιοχή pH 7-11. Η απότομη αύξηση του δυναμικού ζ σε $pH < 7$ (μία τιμή η οποία είναι έξω από την περιοχή που δουλεύουμε) μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα τοιχώματα της στήλης, τα οποία είναι φτιαγμένα από ανοξειδωτο χάλυβα, είναι θετικά φορτισμένα σε $pH < 6$, ενώ σε $pH > 6$ είναι αρνητικά φορτισμένα [48]. Κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες τα σωματίδια αμύλου χαρακτηρίζονται με την ΜΧΦΠ, τα τοιχώματα της στήλης από ανοξειδωτο χάλυβα είναι αρνητικά φορτισμένα. Έτσι, η πιθανότητα κατακράτησης ή αλληλεπίδρασης σωματιδίων αμύλου, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα σε αυτήν την περιοχή pH, με τα τοιχώματα της στήλης ελαχιστοποιείται. Οι αλληλεπιδράσεις, ωστόσο, μεταξύ των σωματιδίων αμύλου είναι σημαντικές στην στερική περιοχή, στις συνθήκες πειράματος που έχουμε.

Καθώς η επιφάνεια της στήλης είναι θετικά φορτισμένη και τα σωματίδια αμύλου έχουν αντίθετα φορτία, παρατηρείται προσκόλληση η έκταση της οποίας είναι μεγαλύτερη σε μικρότερες τιμές pH όπου η στήλη είναι πιο θετικά φορτισμένη. Αυτό επιβεβαιώθηκε, περαιτέρω, με την τεχνική της ΜΧΦΠ, στην οποία καμία καμπύλη έκλουσης δεν εμφανίστηκε μετά την ένεση του δείγματος στη στήλη της ΜΧΠ.

Ως γενικό συμπέρασμα, θα μπορούσαμε να πούμε, ότι η μεταβολή του pH δεν επηρεάζει τις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι που προσδιορίζονται με την τεχνική της ΜΧΦΠ, επομένως δεν παρατηρούνται φαινόμενα διάλυσης και συσσωμάτωσης [49].

Με βάση, λοιπόν, την πιο πάνω μελέτη, θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε στα πιο κάτω συμπεράσματα:

1. Παρατηρείται μια διωνυμική κατανομή μεγέθους για τους πληθυσμούς των μεγάλων και μικρών σωματιδίων αμύλου από σιτάρι.

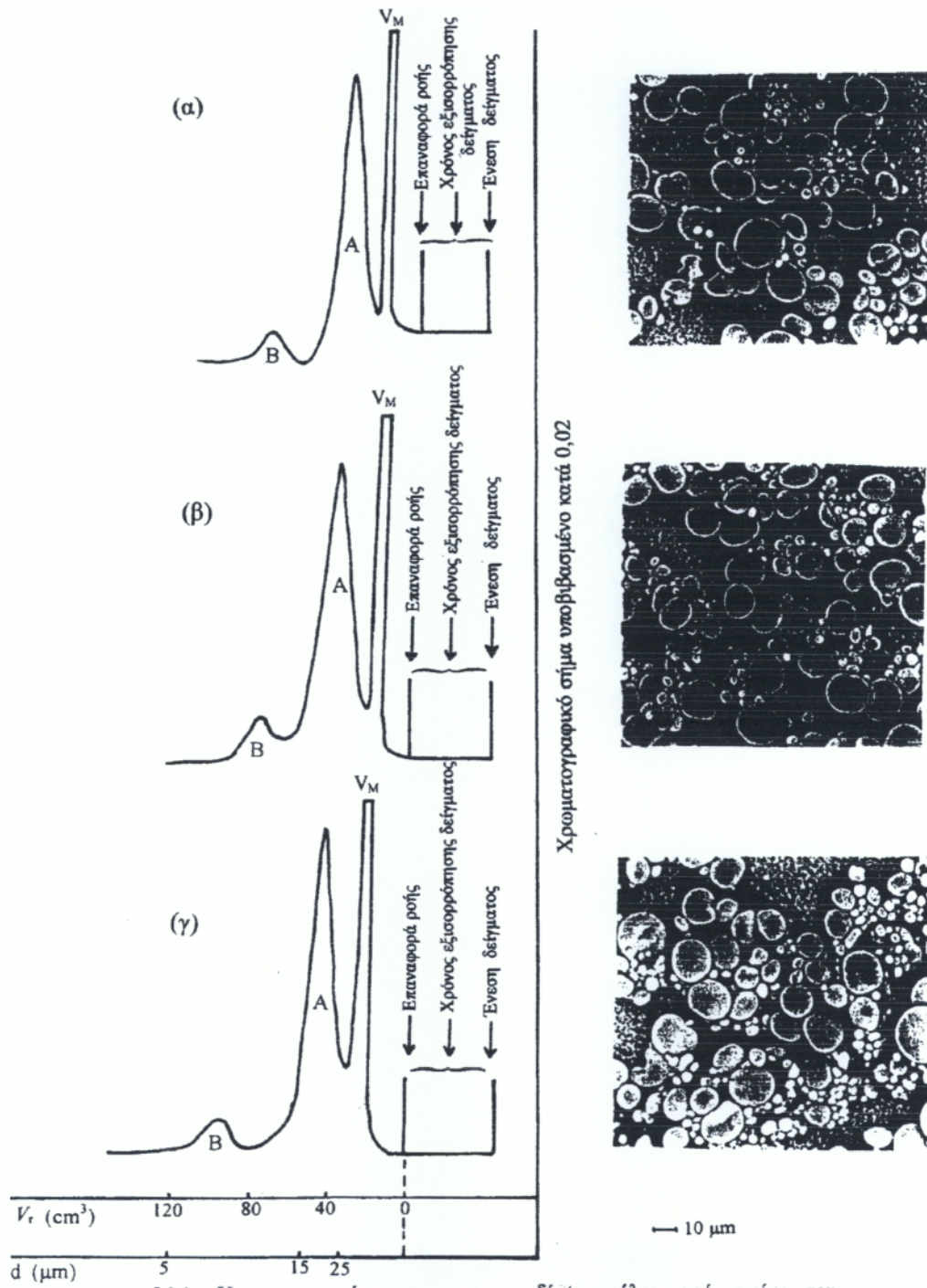
2. Λαμβάνοντας υπόψη τη σταθερή απόκλιση από τις μέσες τιμές των διαμέτρων που υπολογίστηκαν από την ΜΧΦΠ σε συνάρτηση με την πολυδιασπορά του κάθε πληθυσμού αμύλου, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η διαδικασία προετοιμασίας για την λήψη φωτογραφιών SEM φέρνει τα σωματίδια σε μία αφυδατωμένη κατάσταση σε αντίθεση με την υγρή κατάσταση που βρίσκονται κατά την ανάλυσή τους με την ΜΧΦΠ, η συμφωνία μεταξύ των μέσων διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου που υπολογίζονται με την ΜΧΦΠ και εκείνες που βρίσκονται από το SEM είναι σχετικά ικανοποιητική.

3. Η διαφορά ανάμεσα στις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους σωματιδίων μας δείχνει ότι, αν και υπάρχουν πολλά μικρά σωματίδια, η μάζα του αμύλου καθορίζεται, κατά κύριο λόγο, από τα μεγαλύτερα σωματίδια.

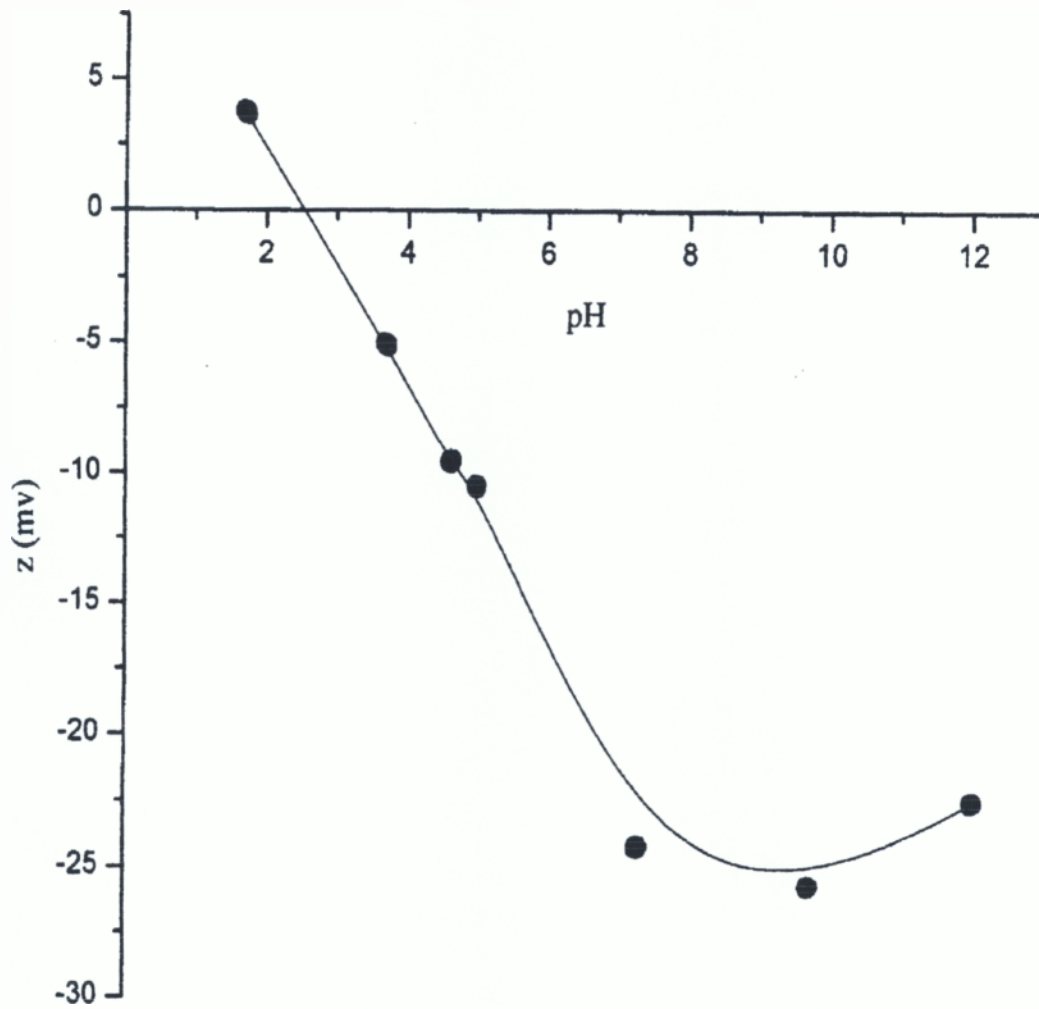
4. Οι μορφές των χρωματογραφημάτων και των φωτογραφιών SEM δεν επηρεάζονται από το pH του μέσου διασποράς, άρα στα σωματίδια αμύλου από σιτάρι δεν παρατηρούνται φαινόμενα διάλυσης και συσσωμάτωσης.

5. Το pH δεν επιδρά στις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους των δύο πληθυσμών σωματιδίων αμύλου από σιτάρι στην περιοχή pH 7–11. Σ' αυτή την περιοχή δεν παρατηρείται προσκόλληση των σωματιδίων του δείγματος στην είσοδο της αναλυτικής στήλης του συστήματος της ΜΧΦΠ. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις φωτογραφίες SEM.

6. Η επίδραση της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων του διαλύματος στο δυναμικό ζ των σωματιδίων αμύλου, δεν είναι πολύ μεγάλη στην περιοχή pH 7–11. Η απότομη αύξηση του δυναμικού ζ σε pH < 7 μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι. Σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες πήραμε κορυφές έκλουσης, το pH μεταβάλλεται μεταξύ των τιμών 7–11 και επειδή τα ιόντα υδρογόνου δεν επιδρούν στο δυναμικό ζ , δεν αναμένεται αυτή η μεταβολή του pH να επηρεάσει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα και το δυναμικό ζ που μετράμε.



Σχήμα 4.1: Χρωματογραφήματα των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι που ελήφθησαν με την τεχνική της ΜΧΦΠ σε διάφορες τιμές pH του μέσου διασποράς, καθώς και οι αντίστοιχες φωτογραφίες SEM: (α) pH=8,0, (β) pH=9,0, (γ) pH=10,0.



Σχήμα 4.2: Μεταβολή του δυναμικού ζ των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι ως συνάρτηση του pH του μέσου διασποράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΜΥΛΟΥ

Όπως φαίνεται από την Εξίσωση

$$V(\mathbf{h}) = V_{DL}(\mathbf{h}) + V_0(\mathbf{h}) =$$

$$= \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2} \right)^3 (\rho_s - \rho) Gx + 16\epsilon \frac{d}{2} (kT/e)^2 \tanh(e\psi_1/4kT) \tanh(e\psi_2/4kT) e^{-kh}$$

$$- \frac{A}{6} \left[\frac{d(d+2h)}{2h(d+h)} - \ln \left(\frac{d+h}{h} \right) \right]$$

η ολική δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης εξαρτάται από το αντίστροφο μήκος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας, κ^{-1} , το οποίο δίνεται από τη σχέση [50,51]

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{8\pi e^2 N_A}{1000 DkT} \right)^{-1/2} \left(\frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \right)^{-1/2} = BI^{-1/2} \quad (5.1)$$

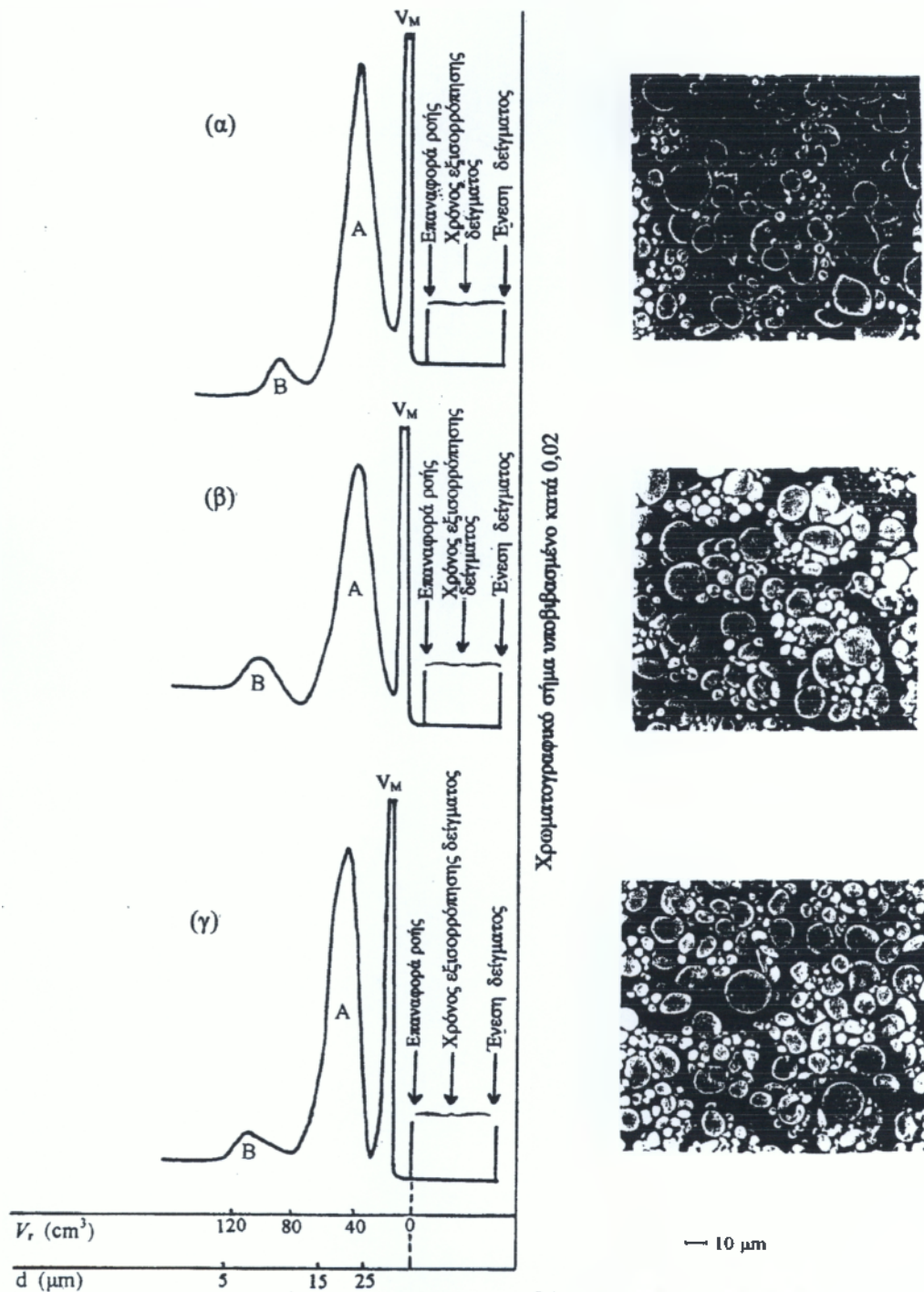
όπου e το ηλεκτρονιακό φορτίο, N_A ο αριθμός Avogadro, D η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, c_i η συγκέντρωση του ιόντος i με σθένος z_i και I η ιοντική ισχύς του μέσου. Μεταβάλλοντας, λοιπόν, την ιοντική ισχύ του μέσου διασποράς του δείγματος του αμύλου, μπορούμε να μεταβάλλουμε τη δυναμική ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των σωματιδίων του αμύλου και των τοιχωμάτων της στήλης του συστήματος της ΜΧΦΠ. Έτσι, οποιαδήποτε μεταβολή παρατηρηθεί στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων αμύλου του αναλυόμενου δείγματος, θα οφείλεται στη μεταβολή της ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς.

Στο Σχ. 5.1 φαίνονται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με την τεχνική της ΜΧΦΠ για τα σωματίδια αμύλου από σιτάρι που είναι διεσπαρμένα σε διάφορα μέσα και περιέχουν διαφορετικά ποσά του ηλεκτρολύτη KNO_3 , καθώς και οι αντίστοιχες φωτογραφίες SEM.

Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο στα χρωματογραφήματα όσο και στις φωτογραφίες SEM, το αναλυόμενο δείγμα εμφανίζει την ίδια μορφή, γεγονός

το οποίο δείχνει ότι δεν υφίστανται φαινόμενα διάλυσης και συσσωμάτωσης των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι, ακόμη και αν η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη (KNO_3) στο μέσο διασποράς μεταβάλλεται κατά ένα παράγοντα της τάξεως των 100.

Για επαλήθευση της παραπάνω παρατήρησης, μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς στις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι που υπολογίστηκαν με βάση την ΜΧΦΠ. Λαμβάνοντας υπόψη τη σταθερή απόκλιση από τις μέσες τιμές των διαμέτρων που υπολογίστηκαν από την ΜΧΦΠ σε συνάρτηση με την πολυδιασπορά του κάθε πληθυσμού αμύλου, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η διαδικασία προετοιμασίας για την λήψη φωτογραφιών SEM φέρνει τα σωματίδια σε μία αφυδατωμένη κατάσταση, σε αντίθεση με την υγρή κατάσταση που βρίσκονται κατά την ανάλυσή τους με την ΜΧΦΠ, η συμφωνία μεταξύ των μέσων διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου που υπολογίζονται με την ΜΧΦΠ και εκείνων που βρίσκονται από τις φωτογραφίες SEM είναι σχετικά ικανοποιητική.



Σχήμα 5.1: Χρωματογραφήματα των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι που ελήφθησαν με την τεχνική της ΜΧΦΠ σε διάφορες τιμές ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς, με τις αντίστοιχες φωτογραφίες SEM: (α) $C_{KNO_3} = 10^{-3}$ M, (β) $C_{KNO_3} = 10^{-2}$ M, (γ) $C_{KNO_3} = 10^{-1}$ M.

Η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών διαμέτρων σωματιδίων που βρέθηκαν με την χρήση της ΜΧΦΠ και εκείνων που υπολογίστηκαν από το SEM αποδίδεται επίσης, στο γεγονός ότι όλες οι επιμέρους τεχνικές της ΜΧΠ δίνουν τις μέσες μαζικές διαμέτρους σωματιδίων καθώς η απόκλιση του ανιχνευτή είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης και του μεγέθους των σωματιδίων, ενώ το SEM δίνει τις μέσες αριθμητικές διαμέτρους σωματιδίων. Για σφαιρικά μονοδιασπαρμένα σωματίδια αυτές οι δύο διάμετροι είναι ταυτόσημες. Για την περίπτωση μας όμως, στην οποία τα σωματίδια αμύλου του κάθε πληθυσμού είναι περίπου σφαιρικά αλλά πολυδιασπαρμένα, είναι διαφορετικές. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των δύο μέσων διαμέτρων, τόσο μεγαλύτερη είναι η διασπορά του μεγέθους των σωματιδίων αμύλου για τον συγκεκριμένο πληθυσμό. Έτσι, η σύγκριση των δύο διαμέτρων γίνεται προσεγγιστικά.

Τα όρια αξιοπιστίας μιας μέσης τιμής για μικρά δείγματα υπολογίζονται από τη σχέση

$$\bar{x} \pm t \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (5.2)$$

όπου \bar{x} η μέση τιμή του δείγματος, σ η σταθερή απόκλιση της μέσης τιμής και t το σφάλμα για συγκεκριμένο επίπεδο σημαντικότητας.

Δύο μέσες τιμές \bar{x}_1 και \bar{x}_2 , ακόμα κι αν προέρχονται από το ίδιο δείγμα, σπανίως είναι ίσες, λόγω στατιστικών διακυμάνσεων, δηλ. τυχαίων σφαλμάτων. Το κριτήριο που καθορίζει αν η διαφορά $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ είναι «σημαντική» ή οφείλεται απλώς σε στατιστικές διακυμάνσεις, είναι το σταθερό σφάλμα της διαφοράς αυτής, σ_δ με τη βοήθεια του οποίου γράφουμε τα όρια αξιοπιστίας της ως

$$(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \pm t_1 \sigma_\delta \quad (5.3)$$

όπου t_1 είναι η τιμή του t όπως ορίζεται από πίνακες για επίπεδο σημαντικότητας 95%. Αν το μηδέν βρίσκεται μεταξύ των ορίων αυτών, δηλαδή αν

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t_1 \sigma_\delta < 0 < |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t_1 \sigma_\delta \quad (5.4)$$

σημαίνει ότι η διαφορά $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ μπορεί να είναι 0, δηλαδή $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$, οπότε «δεν είναι σημαντική» στο ανωτέρω επίπεδο σημαντικότητας. Κατά συνέπεια, η διαφορά των

δύο μέσων τιμών \bar{x}_1 και \bar{x}_2 οφείλεται απλώς σε τυχαία σφάλματα. Αν, αντιθέτως, το 0 είναι έξω από την ανωτέρω περιοχή, η διαφορά $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ «είναι σημαντική», που σημαίνει ότι οι μέσες τιμές \bar{x}_1 και \bar{x}_2 έχουν ουσιαστική διαφορά που δεν οφείλεται σε τυχαία σφάλματα.

Αντί της ανωτέρω διαδικασίας, μπορούμε να υπολογίσουμε την τιμή του t η οποία απαιτείται για να ισχύει η Εξ. 5.4 και κατόπιν να την συγκρίνουμε με την αντίστοιχη βιβλιογραφική τιμή για το συγκεκριμένο επίπεδο σημαντικότητας. Από την Εξ. 5.3, παίρνουμε:

$$\frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sigma_\delta} < t_1 \quad (5.5)$$

Συνεπώς, η τιμή $t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / \sigma_\delta$ πρέπει να είναι μικρότερη από την αντίστοιχη βιβλιογραφική, προκειμένου να βρίσκεται το μηδέν μεταξύ των ορίων, τα οποία καθορίζονται από την Εξ. 5.3, οπότε η διαφορά $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ δεν θα είναι σημαντική.

Αν οι \bar{x}_1 και \bar{x}_2 προέρχονται από μικρά δείγματα, όπως συμβαίνει στη δική μας περίπτωση, η τιμή του t θα δίνεται από τη σχέση

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad (5.6)$$

Εφαρμόζοντας την Εξ. 5.6 στις δύο ακραίες τιμές τόσο των μέσων αριθμητικών όσο και των μέσων μαζικών διαμέτρων των μεγάλων και των μικρών σωματιδίων αμύλου, λαμβάνουμε μία πλήρη στατιστική ανάλυση των τιμών d_N και d_w σε διάφορες τιμές ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν, καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1: Περιέχει τις τιμές του σφάλματος t που υπολογίστηκαν για τις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι σε διάφορες τιμές ιοντικής ισχύος του φέροντος διαλύτη, καθώς και τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές για επίπεδο σημαντικότητας 95 %.

t	d_N		d_n	
	Μεγάλα	Μικρά	Μεγάλα	Μικρά
Πειραματικό	0,77	1,7	0,95	2,18
Θεωρητικό	2,13	2,23	2,13	2,23

Από τα δεδομένα του Πίνακα 5.1 παρατηρείται ότι οι πειραματικές τιμές που προκύπτουν για το σφάλμα t είναι πάντα μικρότερες από τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές. Άρα, η διακύμανση των μέσων τιμών των αριθμητικών και μαζικών διαμέτρων των σωματιδίων αμύλου από σιτάρι με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος του φέροντος διαλύτη οφείλεται σε τυχαία σφάλματα. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το δείγμα σωματιδίων αμύλου από σιτάρι, παρουσία σχετικά μεγάλων ποσοτήτων ηλεκτρολύτη KNO_3 στο μέσο διασποράς, είναι σταθερό και δεν λαμβάνουν μέρος φαινόμενα διάλυσης και συσσωμάτωσης ακόμη και αν η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη KNO_3 στο μέσο διασποράς μεταβάλλεται κατά ένα παράγοντα της τάξεως των 100. Οι φωτογραφίες SEM του Σχ. 5.1 επιβεβαιώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα. Η διαφορά ανάμεσα στις μέσες αριθμητικές και μέσες μαζικές διαμέτρους των σωματιδίων, μας δείχνει ότι αν και υπάρχουν πολλά μικρά σωματίδια, η μάζα του αμύλου καθορίζεται, κατά κύριο λόγο, από τα μεγαλύτερα σωματίδια [49].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΟΚΚΩΝ ΑΜΥΛΟΥ ΣΙΤΟΥ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε βιομηχανικές διεργασίες ζύμωσης, όπως το ψήσιμο, οινοποίηση, ζυθοποιία καθώς και διαβάθμιση καυσίμου, παραγωγή αλκοόλης, οι ζύμες προστίθενται ως αυξητικά. Οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες ζύμες στη βιομηχανία τροφίμων είναι τα στελέχη του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Ζύμες μπορούν να προστεθούν είτε ως ελεύθερα είτε ως ακινητοποιημένα κύτταρα σε κατάλληλο υπόστρωμα. Απολγνιτοποιημένη κυτταρίνη, πηκτικά οξέα, γλουτένη και γ-αλουμίνα χρησιμοποιούνται κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες ως υποστρώματα για ακινητοποίησης στελεχών ζυμών [52-56].

Η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων κατά την αλκοολική ζύμωση είναι μια εφαρμογή της έρευνας η οποία βρίσκει ταχεία ανάπτυξη, λόγω των ελκυστικών τεχνικών και οικονομικών πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με το συμβατικό σύστημα ελεύθερων κυττάρων [57].

Τα υποστρώματα ακινητοποίησης, προκειμένου να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία οίνου πρέπει να πληρούν πρόσθετες προϋποθέσεις όπως η καθαρότητά τους, η παραγωγή προϊόντος υψηλής ποιότητας, να είναι χαμηλού κόστους, σε αφθονία, μη αποικοδομήσιμου χαρακτήρα και κατάλληλα για χαμηλής θερμοκρασίας ζύμωση. Αν και πολλοί τρόποι ακινητοποίησης έχουν προταθεί για χρήση στην οινοποίηση, η βιομηχανική εφαρμογή της τεχνολογίας είναι ακόμα αβέβαιη. Πολλοί υποστηρίζουν ότι συστήματα όπως τα ανόργανα υλικά ή αλγινικού άλατος θεωρήθηκαν ακατάλληλα για οινοποίηση και επομένως τελικά εγκαταλείφθηκαν [58].

Η ακινητοποίηση έχει μια σειρά από τεχνικά και οικονομικά πλεονεκτήματα σε σχέση με το ελεύθερο κυτταρικό σύστημα. Βελτιώσεις στο μέγιστο ποσοστό αύξησης της παραγωγικότητας και στην παραγωγή βιομάζας χρησιμοποιώντας φλούδα πορτοκαλιού ως υπόστρωμα παρατηρήθηκαν σε παρτίδα αερόβιας ζύμωσης

[59]. Επίσης, απαιτήθηκαν μικρότερος χρόνος και θερμοκρασία ζύμωσης με χαμηλότερα υποπροϊόντα παραγωγής [60].

Η σταθερότητα του συστήματος και η δραστηριότητα του βιοκαταλύτη έχουν μεγάλη σημασία για την αποδοχή της καταλληλότητας για βιομηχανικές εφαρμογές. Ακίνητοποίηση της ζύμης σε στερεά μορφή δημιουργεί ένα υλικό με καλύτερες μηχανικές ιδιότητες όπως η αντοχή, ακαμψία και πορώδες, αναγκαία για χρήση του στις διαδικασίες ροής. Οι πιο δημοφιλείς διαδικασίες ακίνητοποίησης βασίζονται σε ομοιοπολική προσκόλληση του μικροοργανισμού σε ένα σταθερό υπόστρωμα ή εγκλωβισμό του σε μια πολυμερή μήτρα [61].

Παρά το γεγονός ότι τα παραπάνω οφέλη είναι γνωστά και μπορεί να αποδεικνύονται με απλή παρατήρηση, είναι σημαντικό για τη βιομηχανική χρήση ζυμομυκήτων η παρακολούθηση της καλλιέργειάς τους και η αύξηση της βιομάζας μέσω των φυσικών ιδιοτήτων των κυττάρων, όπως το μέγεθος, το βάρος ή το σχήμα [62].

Από την άλλη πλευρά είναι χρήσιμος για βιομηχανικές χρήσεις ο διαχωρισμός των διαφόρων σωματιδίων των κυττάρων ζύμης ανάλογα με το μέγεθός τους. Σωματίδια άμυλου από σιτάρι χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ακίνητοποίηση των στελεχών AXAZ-1, ένα αλκοολοανθεκτικό και ψυχρόφιλο στέλεχος του μύκητα *S. cerevisiae*. Η συνολική διαδικασία της κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής βιομάζας μελετήθηκε με την τεχνική της ΜΧΠ.

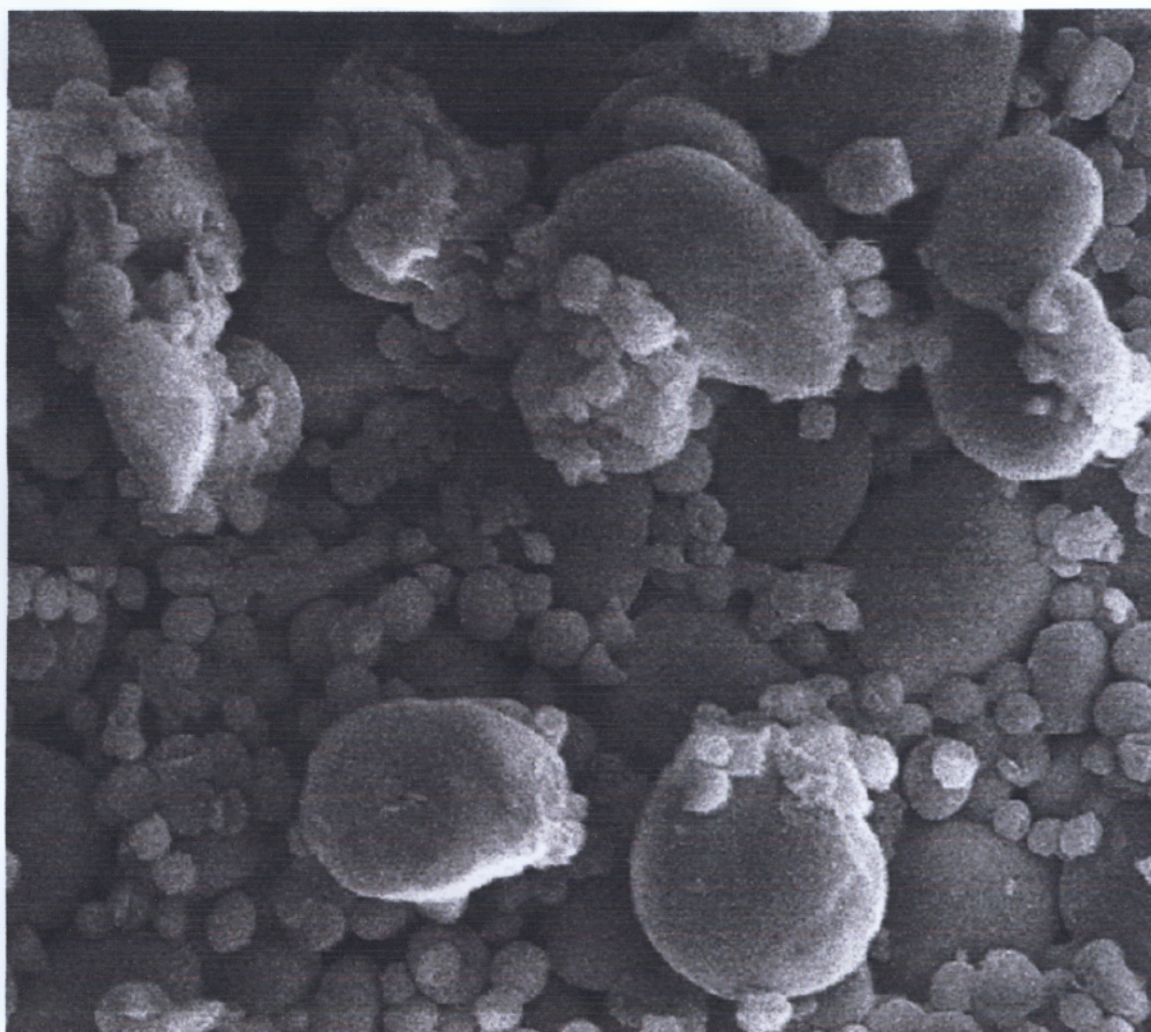
6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΣΙΤΟΥ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *S. CEREVISIAE*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η χρήση των ακίνητοποιημένων κυτταρικών συστημάτων στην οινοποίηση είναι μια περιοχή μεγάλου ενδιαφέροντος. Ωστόσο, θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μάθουμε αν και με ποιο τρόπο αυτή η ακίνητοποίηση επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης. Για την ανάπτυξη αυτού του βιοκαταλύτη, χρησιμοποιήθηκαν κόκκοι άμυλου σίτου ως υπόστρωμα [49]. Η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων άμυλου από σιτάρι είναι ήδη γνωστή. Οι μεγάλοι κόκκοι έχουν διάμετρο περίπου 14 μm και οι μικροί περίπου 6 μm . Είναι επίσης γνωστό [63] ότι τα απλά κύτταρα *S. cerevisiae* έχουν διάμετρο περίπου 4 μm , ενώ τα διπλοειδή κύτταρα (ή ομάδες και αλυσίδες) παρουσιάζουν κατανομή μεγέθους

περίπου 5-9 μm . Είναι προφανές ότι, ανάλογα με το μέγεθός τους, κύτταρα ζύμης μπορούν να ακινητοποιηθούν σε κόκκους αμύλου σίτου. Τα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζουν εξωτερικά υδρόφιλη φύση, η οποία οφείλεται στις επιφανειακές πρωτεΐνες και τα λιπίδια [64]. Η ύπαρξη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στην επιφάνεια του αμύλου σίτου επίσης δημιουργεί ένα υδρόφιλο περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψη ότι (α) το pH του μέσου ανάπτυξης είναι σχεδόν 4,5 και (β) το επιφανειακό δυναμικό τόσο των κυττάρων *S. cerevisiae* όσο και των σωματιδίων αμύλου σίτου είναι αρνητικό σε αυτό το εύρος pH, είναι προφανές ότι δεν μπορεί να συμβεί ηλεκτροστατική ή ομοιοπολική δέσμευση μεταξύ των δύο αυτών υλικών. Έτσι, η ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης στους κόκκους αμύλου οφείλεται σε φυσική προσρόφηση, μια πολύ κοινή διαδικασία η οποία είναι κυρίως κατάλληλη για βιώσιμα κύτταρα όπου η αύξηση των κυττάρων συμβαίνει χωρίς καμία είδους άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και υποστρώματος [65].

Σύμφωνα με την εικόνα SEM η οποία λήφθηκε σε μηδέν χρόνο μετά την προσθήκη των κυττάρων ζύμης στο μέσο ανάπτυξης που περιείχε τους κόκκους αμύλου, η ακινητοποίηση συνέβη σχεδόν ακαριαία. Το υψηλό ποσοστό προσρόφησης των κυττάρων ζύμης επάνω στην επιφάνεια των κόκκων αμύλου μπορεί επίσης να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα *S. cerevisiae* κύτταρα είχαν διατηρηθεί σε μια φάση πείνας πριν από την τοποθέτησή τους στο μέσο, καθώς το ποσοστό προσρόφησης «πεινασμένων» κυττάρων ζύμης είναι πολύ υψηλότερο σε σύγκριση με εκείνα στα οποία παρέχονται θρεπτικά συστατικά [66].

Η αναλυτική στήλη στη ΜΧΠ είναι κατασκευασμένη από Hastelloy-C, ένα κράμα που προσομοιώνει σε ανοξείδωτο χάλυβα και έχει αρνητικό δυναμικό στην περιοχή του pH 5,5 έως 11 [67]. Εκτός αυτού, το επιφανειακό δυναμικό των κυττάρων *S. cerevisiae* γίνεται πιο αρνητικό καθώς το pH αυξάνεται, γεγονός που τείνει να αυξήσει την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των κυττάρων αλλά και των κυττάρων με το υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ένα αλκαλικό περιβάλλον προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των σωματιδίων όσο και των σωματιδίων με το υλικό της στήλης. Έτσι, επιλέχθηκε η επιφανειοδραστική ουσία FL-70 (pH = 9,0) ως πρόσθετο στο φέροντα διαλύτη, προκειμένου να αποφευχθούν οι προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του δείγματος ζύμης με τη ΜΧΠ.



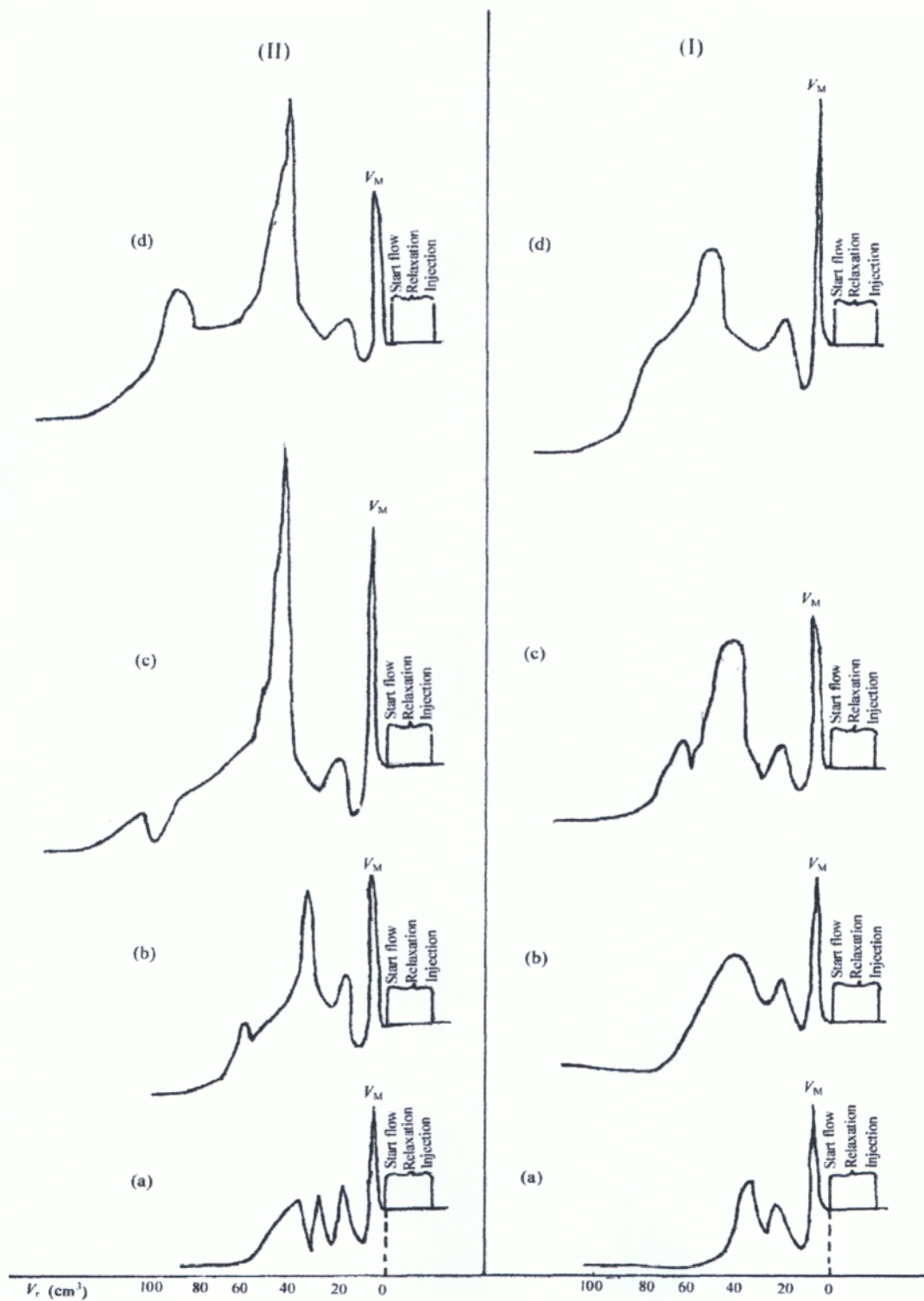
Εικόνα 6.1 Εικόνα SEM όπου φαίνεται η ακινητοποίηση κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* σε κόκκους από άμυλο σίτου.

Το σχήμα 6.2 δείχνει τέσσερα χρωματογραφήματα, που εκφράζουν την απόκριση του ανιχνευτή σε σχέση με τον όγκο συγκράτησης σε διάφορους χρόνους από την προετοιμασία του δείγματος (I) για τα ελεύθερα και (II) τα ακινητοποιημένο σε κόκκους άμυλου στελέχη *S. Cerevisiae*. Στην περίπτωση του ελεύθερου κύτταρου, σχήμα 6.1(I), εμφανίζεται μια ενιαία κατανομή μεγέθους των στελεχών *S. cerevisiae* αμέσως μετά τη διασπορά των κυττάρων στο μέσο ανάπτυξης, σχήμα 6.1 (Ia). Με το χρόνο, καθώς τα κύτταρα ζύμης έχουν αρχίσει να καταναλώνουν θρεπτικό υλικό, οι μεταβολικές δραστηριότητές τους είναι σε πλήρη ανάπτυξη. Τα μικρού μεγέθους κύτταρα ζύμης αρχίζουν να μεγαλώνουν και να εκβλαστάνουν, ενώ τα μεγάλα

σχηματίζουν αλυσίδες ή συστάδες. Έτσι, τα στελέχη *S. cerevisiae* δείχνουν μια ευρεία κατανομή μεγέθους, σχήμα 6.1 (Ib). Στη συνέχεια αρχίζει η διαδικασία της διαίρεσης των κυττάρων που συνεπάγεται τη δημιουργία νέων κυττάρων ζύμης μικρού μεγέθους (απλά κύτταρα) και οδηγεί σε μια τριωνυμική κατανομή μεγέθους, σχήμα 6.1(Ic). Τέλος, μια κατανομή μεγέθους εμφανίζεται ξανά. Σχήμα 6.1 (Id). Σε όλες τις περιπτώσεις, μετά τη μείωση της έντασης του πεδίου στο μηδέν, καμία κορυφή δεν αποκτήθηκε, πράγμα που σημαίνει ότι δεν κατακρατήθηκαν κύτταρα ζύμης στη στήλη. Για $t < 140$ λεπτά από την προετοιμασία του δείγματος, η κατανομή του μεγέθους των κυττάρων διατηρείται σταθερή, σύμφωνα με τις τιμές του όγκου έκλουσης, V_t , που αντιστοιχούν στα μέγιστα των κορυφών έκλουσης, παρά την παράλληλη αύξηση της μάζας των κυττάρων. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι, παρόλο που τα κύτταρα καταναλώνουν θρεπτικό μέσο, κανένα φαινόμενο ανάπτυξης και διαίρεσης κυττάρων δεν είναι σε εξέλιξη. Αυτό αποδεικνύει ότι απαιτείται μία περίοδος προετοιμασίας πριν τα κύτταρα αρχίζουν να εκβλαστάνουν (περίοδος lag).

Η φάση ανάπτυξης ακολουθεί τη φάση υστέρησης από τη στιγμή που η δημιουργία επαρκών αποθεμάτων έχει συσταθεί στα κύτταρα ζύμης. Για $140 < t < 420$ λεπτά από την προετοιμασία του δείγματος, τα στελέχη του *S. cerevisiae* δείχνουν μια ευρεία κατανομή μεγέθους η οποία οφείλεται στη δημιουργία αλυσίδων ή/και συστάδων κυττάρων ζύμης. Επομένως, σχήμα 6.1(Ic), όταν ένα κρίσιμο μέγεθος έχει επιτευχθεί, ενεργοποιείται μία σειρά διαδικασιών η οποία οδηγεί στη διάσπαση. Ωστόσο, η διάσπαση των διπλών κυττάρων που δημιουργήθηκαν από την εκβλάστηση δεν είναι πλήρης και ορισμένα διπλοειδή κύτταρα παραμένουν ανέγγιχτα. Εξάλλου, ένα ποσοστό των διπλοειδών κυττάρων συνεχίζουν την ανάπτυξή τους, είτε δίνοντας αλυσίδες ή ομάδες κυττάρων ζύμης. Πρόκειται για μια νέα κατανομή μεγέθους, αρκετά διαφορετική από την πρώτη, σχήμα 6.1(Id). Το εμβαδό των κορυφών έκλουσης είναι πλέον αρκετά μεγαλύτερο, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας που οφείλεται στην εκθετική αύξηση του αριθμού των κυττάρων με χρόνο διπλασιασμού ίσο με τη μέση τιμή του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης. Το συνολικό ποσό της γλυκόζης καταναλώθηκε από τα κύτταρα *S. cerevisiae* σε χρόνο ίσο με 705 λεπτά. Σχεδόν η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης, σχήμα 6.1(II). Οι διαφορές στις μορφές των χρωματογραφημάτων είναι κυρίως λόγω της παρουσίας κόκκων του αμύλου σίτου στο θρεπτικό υγρό. Έτσι, σε μηδέν χρόνο, σχήμα 6.1(IIa), εμφανίζεται μία τριωνυμική κατανομή μεγέθους, η οποία παρατηρείται κατά τη

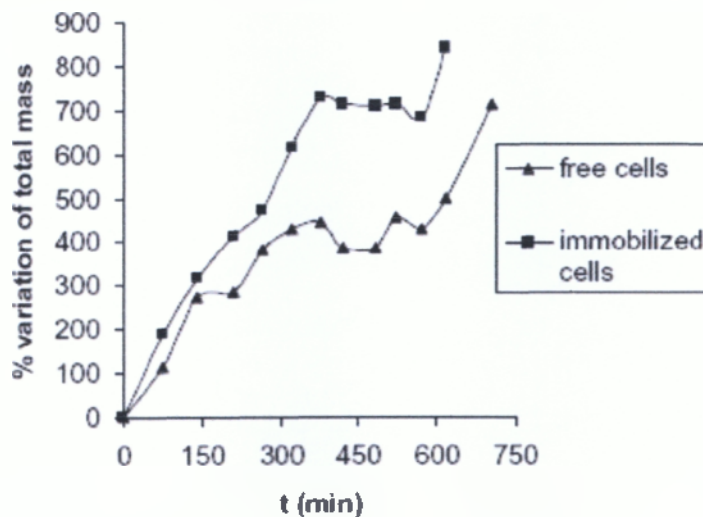
διάρκεια της όλης διαδικασίας. Η πρώτη κορυφή, η οποία αντιστοιχεί σε χαμηλότερες τιμές όγκου έκλουσης σε σύγκριση με εκείνον της πρώτης κορυφής στην περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων οφείλεται στην παρουσία των μεγάλων σωματιδίων αμύλου. Με το πέρασμα του χρόνου, λαμβάνουν χώρα οι ίδιες διαδικασίες όπως πριν και μία διευρυμένη κατανομή μεγέθους εμφανίζεται. Το σχήμα των κορυφών έκλουσης είναι πλέον διαφορετικό.



UV signal attenuated by 0.02

Σχήμα 6.2 Φρακτογράμματα της (I) δωρεάν και (II) ακινητοποιηθεί για άμυλο σίτου κόκκους *Saccharomyces cerevisiae* στελέχη που λαμβάνεται με SD / StFFF κατά καιρούς από την προετοιμασία του δείγματος: (α) $t = 0$ min, (β) $t = 140$ min, (γ) $t = 420$ min και (δ) $t = 705$ λεπτά για την ελεύθερη και $t = 605$ λεπτά για τα ακινητοποιημένα κύτταρα.

Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος και οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή βιομάζας. Η συνολική διαδικασία ολοκληρώνεται σχεδόν σε 90 λεπτά πιο γρήγορα από ότι στην περίπτωση ελεύθερων κύτταρων, ένα γεγονός με μεγάλη σημασία για την παραγωγή ζύμης βιομηχανίες.



Σχήμα 6.3 Επί τοις εκατό μεταβολή της συνολικής μάζας του *S. Cerevisiae* απουσία και παρουσία κόκκων σίτου αμύλου.

Το κύριο πλεονέκτημα της ακινητοποίησης είναι τα υψηλά επίπεδα της παραγωγής βιομάζας. Το σχήμα 6.3 παρουσιάζει μια γραφική αναπαράσταση του % ποσοστού της διακύμανσης του συνολικού εμβαδού του κάθε χρωματογραφήματος με το χρόνο (α) για τα ελεύθερα και β) για τα ακινητοποιημένα κύτταρα *S. cerevisiae*. Στην περίπτωση των στελεχών *S. cerevisiae*, η πυκνότητα των κυττάρων ζύμης κυμαίνεται από 1,1068 έως 1,1168 g/mL με μέση διαφορά πυκνότητας 0,01 g/mL [68]. Αυτό σημαίνει ότι όλες οι διαφορές που σημειώνονται στην περιοχή της κορυφής έκλυσης οφείλονται σε σωματίδια με σταθερή πυκνότητα και έτσι το εμβαδό των κορυφών θα μπορούσε να υποτεθεί ότι είναι ανάλογο με το μέγεθος των σωματιδίων και, κατά συνέπεια, με τη μάζα των κόκκων [69]. Τέλος, υπό αυτές τις συνθήκες, από το σχήμα 6.3 είναι φανερό ότι η ακινητοποίηση των στελεχών *S. cerevisiae* σε κόκκους αμύλου σίτου συνεπάγεται μια απότομη αύξηση της παραγόμενης βιομάζας. Πιθανότατα, αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ της επιφάνειας στήριξης και τον ίδιο το μικροοργανισμό δεν προκαλεί αναγκαστικά

περιορισμό της λειτουργίας για το πρώτο στρώμα προσροφημένων κυττάρων [70], όπως αυτό ελέγχεται επίσης από το SEM. Η πιθανότητα ότι τα υψηλά επίπεδα της βιομάζας θα μπορούσαν να οφείλονται σε αποσύνθεση των κόκκων αμύλου λόγω της ύπαρξης των κυττάρων *S. cerevisiae* φαίνεται να μην ισχύει, δεδομένου ότι η αμυλάση, η οποία είναι αναγκαία για μια τέτοια δραστηριότητα των κυττάρων ζύμης, δεν είναι παρούσα στην καλλιέργεια. Ίδια αποτελέσματα προέκυψαν από ακινητοποίηση των *S. cerevisiae* κυττάρων σε πορώδες γυαλί [71], η οποία προκάλεσε 5-πλάσια αύξηση του μεταβολικού ρυθμού, το ποσό γλυκόζης που μετατρέπεται σε αιθανόλη αυξήθηκε, ενώ η απόδοση του CO₂ μειώθηκε. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές [72], καθώς ο ρυθμός προσρόφησης O₂ από κύτταρα *S. cerevisiae* ακινητοποιημένα σε κεραμικά ήταν επτά φορές υψηλότερος σε pH 4 και τέσσερις φορές υψηλότερος σε pH 6 σε σύγκριση με ελεύθερα κύτταρα *S. Cerevisiae*. Εκτός αυτού, κύτταρα *S. cerevisiae* ακινητοποιημένα σε γυάλινες χάντρες επικαλυμμένες με λεπτό υμένιο ζελατίνης εμφανίζουν αύξηση των ποσοστών της παραγωγής αιθανόλης και της κατανάλωσης γλυκόζης σε σύγκριση με ελεύθερα κύτταρα [73].

Συνεπώς, η ΜΧΠ αποδείχθηκε ότι είναι μια αναλυτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του *S. cerevisiae in situ*. Εφαρμόστηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό της μεταβολής της κατανομής του μεγέθους των κυττάρων και την παραγωγή βιομάζας. Αποδείχθηκε επίσης ότι η χρήση υποστρώματος, όπως κόκκοι αμύλου, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης. Το γεγονός ότι (α) το άμυλο σίτου είναι ένα φθινό και διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες υλικό, (β) η διαδικασία ακινητοποίησης είναι απλή και αποτελεσματική όσον αφορά την απόδοση και την διατήρηση της ενζυματικής δραστηριότητας, (γ) η ικανότητα και η αποτελεσματικότητα του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη είναι υψηλή και (δ) από την άποψη ότι ο χειρισμός του βιοκαταλύτη και ο μηχανικός σχεδιασμός του αντιδραστήρα είναι απλός, δεδομένου ότι δεν απαιτείται ειδική αντιμετώπιση, καθιστά το άμυλο ένα πολύ ελπιδοφόρο υλικό για χρήση στη βιοτεχνολογία τροφίμων με έμφαση στην ακινητοποίηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΧΡΗΣΗ ΑΜΥΛΟΥ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια διάφορα συστήματα ακινητοποίησης των κυττάρων έχουν προταθεί για χρήση σε βιομετατροπές όπως η αλκοολική ζύμωση. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε πολλά πλεονεκτήματά τους, όπως η βελτίωση της παραγωγικότητας σε σύγκριση με το ελεύθερο κυτταρικό σύστημα. Μεταξύ των τεχνικών που έχουν προταθεί για την ακινητοποίηση των κυττάρων, η πιο σημαντική είναι η μηχανική συγκράτηση, η παγίδευση μέσα σε μία πορώδη μήτρα, η κροκιδωση κυττάρων (ομαδοποίηση), και η ακινητοποίηση σε στερεές επιφάνειες [74].

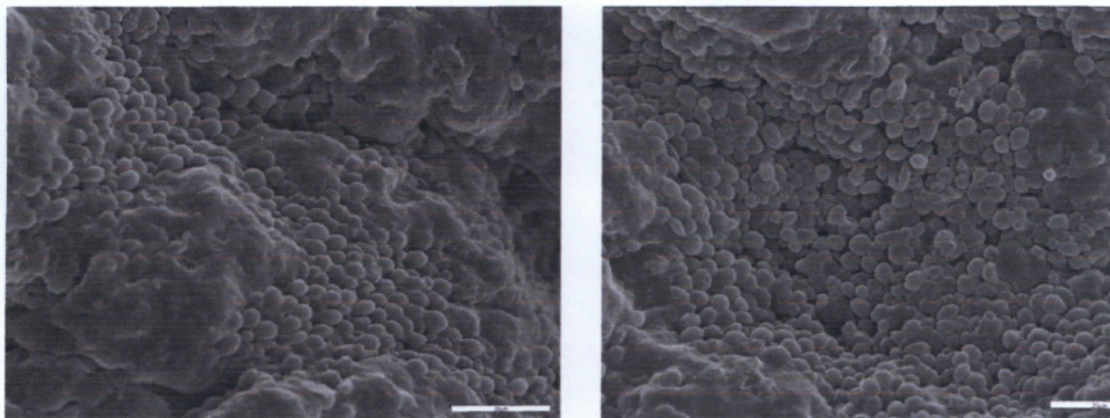
Διάφορα υλικά (συνθετικά, φυσικά, οργανικά και ανόργανα) έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα ακινητοποίησης κυττάρων [75-80]. Τα τελευταία χρόνια αρκετά υποστρώματα από τρόφιμα υψηλής καθαρότητας, όπως απολιγνιτοποιημένη κυτταρίνη, σφαιρίδια γλουτένης, τα ξερά σύκα, τεμάχια φρούτων και πατάτες έχουν προταθεί ως ιδανικά για ακινητοποίηση ζύμης για την οινοποίηση και ζυθοποιία. [81-87]. Η ακινητοποίηση αλκοολοανθεκτικών και ψυχρόφιλων στελεχών ζύμης σε αυτά τα υποστρώματα οδήγησε σε χαμηλής θερμοκρασίας οινοποίηση και ζυθοποίηση, με αποτέλεσμα κρασιά και μύρες με βελτιωμένη γεύση και άρωμα. Αν και αρκετά υποστρώματα ακινητοποίησης έχουν προταθεί για την αλκοολική ζύμωση, μόνο λίγα βρίσκουν εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο, και επομένως η αναζήτηση για νέο υλικό έχει μεγάλο ενδιαφέρον.

Η χρήση υλικών απολιγνιτοποιημένης κυτταρίνης ως υπόστρωμα για ακινητοποίηση ζύμης αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική για χαμηλής θερμοκρασίας οινοποίηση και ζυθοποίηση. [81,88]. Μελέτες, με βάση μια θεωρητική προσέγγιση της εξίσωσης *Arrhenius*, έδειξαν ότι οι ζυμώσεις σε χαμηλή θερμοκρασία που προέκυψαν με χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων είναι υπεύθυνες για τη μείωση της

ενέργειας ενεργοποίησης, E_a , κατά την παρουσία αυτού του υποστρώματος. Μέσα από μια πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιώντας κύτταρα ζύμης ακινητοποιημένα σε πατάτες, η μειωμένη ενέργεια ενεργοποίησης και η υψηλότερη σταθερά ταχύτητας αντίδρασης στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πατάτες μπορούν να συμπεριφέρονται ως καταλύτης ή προωθητής των ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία.

7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΗΡΙΞΗΣ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διάλυμα αμύλου καλαμποκιού σε νερό παρασκευάστηκε και θερμάνθηκε στους 90-95 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία, υψηλότερη από τη θερμοκρασία ζελατινοποίησης, οι κόκκοι αμύλου καλαμποκιού υπέστησαν μη αντιστρεπτό λιώσιμο, και καθώς ψύχονταν, προκλήθηκε κρυστάλλωση και σχηματίστηκε ένα ελαστικό gel. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ψύξης και πριν από το σχηματισμό gel, σε ~ 40 ° C, τα κύτταρα ζύμης προστεθήκαν και το σύνολο αφέθηκε στους 15 ° C για πλήρη σχηματισμό gel. Η ακινητοποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Σχήμα 7.1), που δείχνει ότι τα κύτταρα ζύμης που προστέθηκαν παραμένουν στην επιφάνεια του gel αμύλου καλαμποκιού και επίσης ανακατεύονται και παγιδεύονται μέσα στο gel.



Σχήμα 7.1 Ηλεκτρικές μικρογραφίες του gel αμύλου καλαμποκιού με τα ακινητοποιημένα κύτταρα του *S. cerevisiae* AXAZ-1.

Επιπλέον, η ακινητοποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε με τη χρήση των νέων βιοκαταλυτών για επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις της γλυκόζης και του γλεύκους σταφυλιών σε διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις σακχάρων.

Επαναλαμβανόμενες παρτίδες ζύμωσης

Αρχικά, ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε για επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις της γλυκόζης (6 και 8 °Be) και γλεύκους σταφυλιών (10-17 °Be) στους 27 °C, και μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων. Η συγκέντρωση σακχάρων επηρεάζει σημαντικά το χρόνο ζύμωσης, τα αζύμωτα σάκχαρα, τη μετατροπή, την περιεκτικότητα σε αιθανόλη, και την παραγωγή αιθανόλης και κρασιού. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε για 18 επαναλαμβανόμενες παρτίδες ζύμωσης και διατήρησε τη λειτουργική του σταθερότητα για περισσότερο από 2,5 μήνες. Όλες οι ζυμώσεις οδήγησαν σε προϊόντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (από ίχνη έως 8,8 g/L) και κατ'επέκταση υψηλές μετατροπές (από 94,5 έως 100%). Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε γλεύκος σταφυλιών πυκνότητας 14 και 17 °Be, παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις αζύμωτων σακχάρων (έως 57,4 g/L) και χαμηλότερες μετατροπές. Όσον αφορά την επίδραση του gel αμύλου καλαμποκιού που υποστηρίζει τον βιοκαταλύτη και την αρχική συγκέντρωση σακχάρων στο άρωμα, εξετάστηκε ο σχηματισμός των σημαντικότερων πτητικών παραπροϊόντων. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων επηρέασε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των πιο πτητικών παραπροϊόντων, αλλά δεν επηρέασε ισοβουτανόλη και αμυλική αλκοόλη. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης και αμυλικών αλκοολών κυμαίνονταν από 14,3 έως 28,3 mg/L και 86 με 165,6 mg/L, αντίστοιχα. Η 1-προπανόλη βρέθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση από ίχνη έως 11,8 mg/L. Οξικός αιθυλεστέρας και η ακεταλδεΐδη εντοπίστηκαν σε συνήθη επίπεδα που συμβάλλουν θετικά στο άρωμα κρασιού. Η περιεκτικότητα σε μεθανόλη επηρεάστηκε σημαντικά από το μέσο ζύμωσης, κυμαινόμενη από 26,7 mg/L, όταν χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη, έως 102,4 mg/L, όταν χρησιμοποιήθηκε μούστος [89].

Οινοποίηση από βιοκαταλύτες με gel αμύλου καλαμποκιού

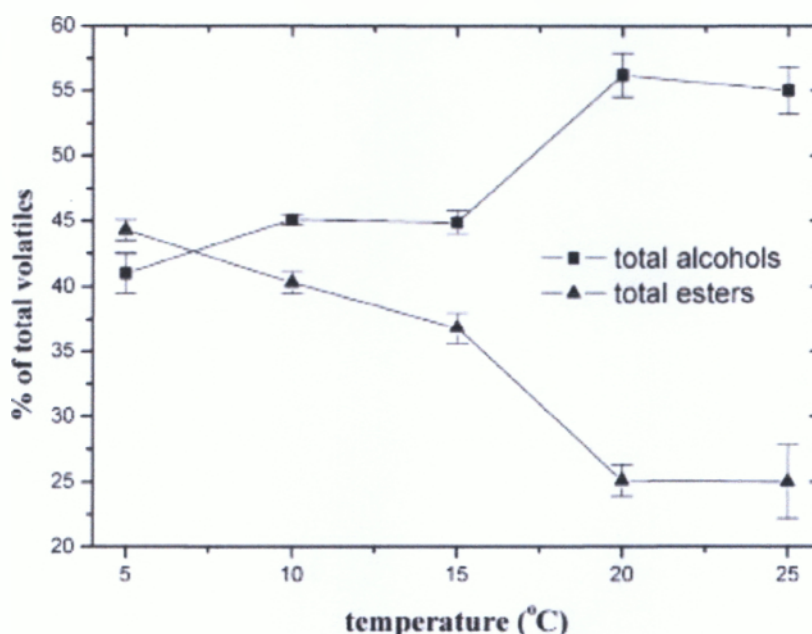
Οι τέσσερις πρώτες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε 30 °C με τη βοήθεια συνθετικού μέσου γλυκόζης με συγκέντρωση γλυκόζης από 112 έως 145 g/L για την

καλύτερη προσαρμογή των βιοκαταλυτών. Όλες οι άλλες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν από γλεύκος σταφυλιών με αρχική περιεκτικότητα σε σάκχαρα που κυμαίνονταν μεταξύ 199 και 215 g/L, ενώ η θερμοκρασία μειώθηκε σταδιακά σε 25, 20, 15, 10, και 5 °C με πέντε επαναλαμβανόμενες παρτίδες ζύμωσης σε κάθε θερμοκρασία. Η θερμοκρασία ζύμωσης επηρέασε σημαντικά το χρόνο ζύμωσης και την παραγωγή αιθανόλης και κρασιού, αλλά δεν επηρέασε τα αζύμωτα σάκχαρα, τη συγκέντρωση αιθανόλης και τη μετατροπή. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης διατήρησε τη σταθερότητα λειτουργίας του για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 12 μηνών, ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες, και παρήγαγε οίνους σε 3 ημέρες στους 25 °C και σε 55 ημέρες σε 5 °C. Τα κρασιά που παρήχθησαν ήταν υψηλής διαύγειας και περιείχαν αλκοόλη σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές των ξηρών επιτραπέζιων οίνων. Πιο συγκεκριμένα, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν χαμηλές [από ~2,5 g/L στους 30 °C έως ~0,2 g/L στους 5 °C (υγρό βάρος)], ειδικότερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, που δείχνουν ότι οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν από τα ακινητοποιημένα κύτταρα. Η παραγωγικότητα σε αιθανόλη και κρασί ήταν σχετικά υψηλή, ενώ η ολική οξύτητα και η πτητική οξύτητα ήταν στα επίπεδα των εμπορικών ξηρών οίνων. Η θερμοκρασία ζύμωσης δεν επηρέασε την πτητική οξύτητα, αλλά επηρέασε σημαντικά την ολική οξύτητα. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές της ολικής οξύτητας στους 30, 25, και 20 °C ήταν σημαντικά υψηλότερες από ό, τι αυτές που παρατηρήθηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (15, 10 και 5 °C).

Σημαντικά Πτητικά Παραπροϊόντα

Η πλειοψηφία των ενώσεων που συμβάλλουν στο άρωμα των οίνων παράγονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους σταφυλιών. Πολύ λίγα είναι αυτά που προέρχονται από τα σταφύλια. Οι πιο άφθονες ενώσεις στο άρωμα του οίνου είναι ακεταλδεΐδη, οξικός αιθυλεστέρας, 1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, και άμυλο αλκοόλης [90]. Όπως είναι προφανές, η θερμοκρασία ζύμωσης επηρέασε σημαντικά όλα τα ουσιαστικά πτητικά παραπροϊόντα. Η ακεταλδεΐδη κυμάνθηκε σε συγκέντρωση από 64 έως 23 mg/L. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε 25 και 20 °C, ενώ η μείωση της θερμοκρασίας ζύμωσης οδήγησε σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στους 10 και 5 °C, όπου η συγκέντρωση ακεταλδεΐδης κυμάνθηκε από χαμηλές συγκεντρώσεις έως 30 mg/L. Η συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα κυμαίνονταν από 41 mg/L στους 30 °C έως 94 mg/L στους 5 °C, και παρατηρήθηκε

σημαντική αύξηση με πτώση της θερμοκρασίας ζύμωσης. Αμυλικές αλκοόλες, ισοβουτανόλη και 1-προπανόλη ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις που συμβάλλουν στην ευχάριστη γεύση των παραγόμενων οίνων και μία σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις τους παρατηρήθηκε με την πτώση της θερμοκρασίας ζύμωσης [91,92].



Σχήμα 7.2 Επίδραση της θερμοκρασίας σε ποσοστά επί του συνόλου των εστέρων και των συνολικών αλκοολών επί του συνόλου των πτητικών ουσιών των οίνων που παράγονται από ακινητοποιημένα κύτταρα.

SPME-GC-MS Ανάλυση των Κρασιών

Συνολικά, εντοπίστηκαν 80 ενώσεις, εκ των οποίων 42 σε μούστο και 48 και 49 σε οίνους που παράχθηκαν στους 15 °C με ελεύθερη και ακινητοποιημένα κύτταρα, αντίστοιχα, ενώ περαιτέρω μείωση θερμοκρασίας οδήγησε σε μια μικρή αύξηση σε 54 ενώσεις στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων. Η ανάλυση έδειξε ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα παρήγαγαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις των εστέρων και άλλων ενώσεων που παρέχουν βελτιωμένα χαρακτηριστικά γεύσης. Η μείωση της θερμοκρασίας ζύμωσης από 25 σε 15 °C

οδήγησε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων, ενώ η περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας έως 5 °C οδήγησε σε μειωμένες συγκεντρώσεις [87,93]. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν επίσης μία αύξηση του ποσοστού του συνόλου των εστέρων και μείωση του ποσοστού των ανώτερων αλκοολών με την πτώση της θερμοκρασίας από 15 σε 5 ° C (Σχήμα 7.2), η οποία είναι σε συμφωνία με άλλες πρόσφατες μελέτες και θεωρείται ότι έχει θετικό αντίκτυπο για το άρωμα του κρασιού [87,93].

Εστέρες

Ένα σύνολο 29 εστέρων εντοπίστηκαν σε κρασιά του παρούσας μελέτης. Και στις δύο περιπτώσεις, με ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα, παρατηρήθηκε μία αύξηση των συγκεντρώσεων των εστέρων με μείωση της θερμοκρασίας στους 15 ° C, ενώ περαιτέρω μείωση θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση των παραγόμενων εστέρων. Ωστόσο, σε όλες τις θερμοκρασίες οίνοι που παρήχθησαν από ακινητοποιημένα κύτταρα παρουσίασαν αύξηση του αριθμού και των συγκεντρώσεων των εστέρων από εκείνους που παρήχθησαν από τα ελεύθερα κύτταρα. Ο κύριος εστέρας στα δείγματα και τα κρασιά μας σε γενικές γραμμές ήταν οξικός αιθυλεστέρας. Άλλοι εστέρες παρόντες σε όλα τα δείγματα κρασιών ήταν εκείνοι των *fusel* αλκοολών και των μικρής αλυσίδας λιπαρών οξέων, οι λεγόμενοι «εστέρες φρούτων». Στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Εστέρες εκτός από τον οξικό αιθυλεστέρα ανιχνεύθηκαν στα δείγματα. Αυτά τα συστατικά είναι υπεύθυνα για ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα [92]. Ο εστέρας που ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα οίνου αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ακινητοποιημένα κύτταρα, ήταν ο 2-φαινυλαιθυλεστέρας, δίνοντας άρωμα μπανανόμηλου [91].

Οξέα

Τα λιπαρά οξέα, λόγω της ήπιας γεύσης τους και των ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεών τους σε κρασιά, θεωρείται ότι έχουν επίπτωση στη γεύση στα κρασιά [94]. Ο αντίκτυπος αυτός είναι θετικός, συμβάλλοντας σε μία σύνθεση του μπουκέτου αρωμάτων, σε συγκεντρώσεις μέχρι των ελάχιστων ορίων τους, αλλά αρνητικός σε υψηλότερες συγκεντρώσεις [89]. Μια θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος και η ποιότητα των παραγόμενων οίνων έχει αναφερθεί [94].

Αλκοόλες

Οι *fusel* αλκοόλες θεωρείται γενικά ότι έχουν μάλλον δυσάρεστες μυρωδιές. Ως εκ τούτου, πιστεύεται ότι συμβάλλουν περισσότερο στην ένταση της μυρωδιάς του κρασιού παρά στην ποιότητά του [94]. Η 2-φαινυλαιθανόλη, η οποία είναι μία από τις λίγες *fusel* αλκοόλες που περιγράφονται με μια ευχάριστη μυρωδιά παλιών ρόδων [85,94], ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα οίνου, και παρατηρήθηκε μία μείωση της περιεκτικότητας της σε χαμηλές θερμοκρασίες (10 και 5 °C) [87,95].

Καρβονλικές Ενώσεις

Η βενζαλδεΐδη που ανιχνεύτηκε σε μούστο και σε οίνους είχε μια γεύση πικραμύγδαλου, ενώ η β-δαμασκινόνη που ανιχνεύθηκε σε μούστο και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε οίνους με ακινητοποιημένα κύτταρα σε όλες τις θερμοκρασίες είχε μια σύνθετη οσμή λουλουδιών, τροπικών φρούτων και μήλου [91,96].

Ενώσεις Τερπενίων

Τα τερπένια, τα οποία προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, είναι κύρια συστατικά που συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμα του κρασιού [97]. Η λιναλοόλη δίνει μια περίτεχνη οσμή [97] και είχε εντοπιστεί μόνο σε γλεύκος σταφυλιών σε επίπεδα λίγο υψηλότερα από το όριο ανίχνευσής της [0,05 mg/L] [91]. Τα οξείδια της α-τερπινεόλης, της φαρνεσόλης και της *cis*-λιναλοόλης ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλα τα δείγματα οίνων που παρήχθησαν από ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα.

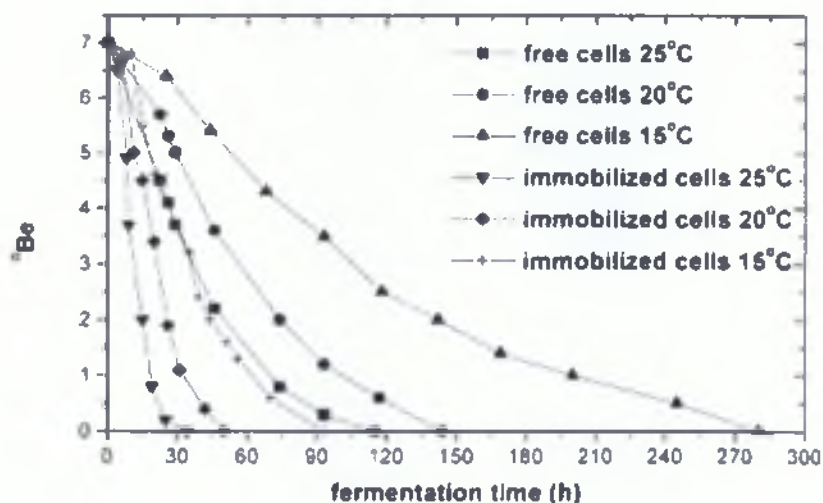
Ωστόσο, λόγω των υψηλών ορίων ανίχνευσής τους, που κυμαίνονται από 0,4 mg/L (για την α-τερπινεόλη) σε 1-5 mg/L (για οξύδιο της *cis*-λιναλοόλης), έχουν πολύ μικρό αντίκτυπο στην οσμή των οίνων [91]. Το λιμονένιο, έχοντας οσμή όπως τα εσπεριδοειδή, ανιχνεύτηκε μόνο σε γλεύκος σταφυλιών και σε κρασί που παράχθηκε από τα ελεύθερα κύτταρα στους 15 °C. Η β-κιτρονελλόλη ήταν ανιχνεύσιμη σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από το όριο ανίχνευσής της [0,018 mg / L] [91] σε οίνους που παρήχθησαν από ακινητοποιημένα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (10 και 5 ° C) και θεωρείται ότι δίνει μία νότα αρωματικού γλυκού κίτρου [97,98].

Καταλυτική επίδραση του Gel αμύλου καλαμποκιού στην αλκοολική ζύμωση

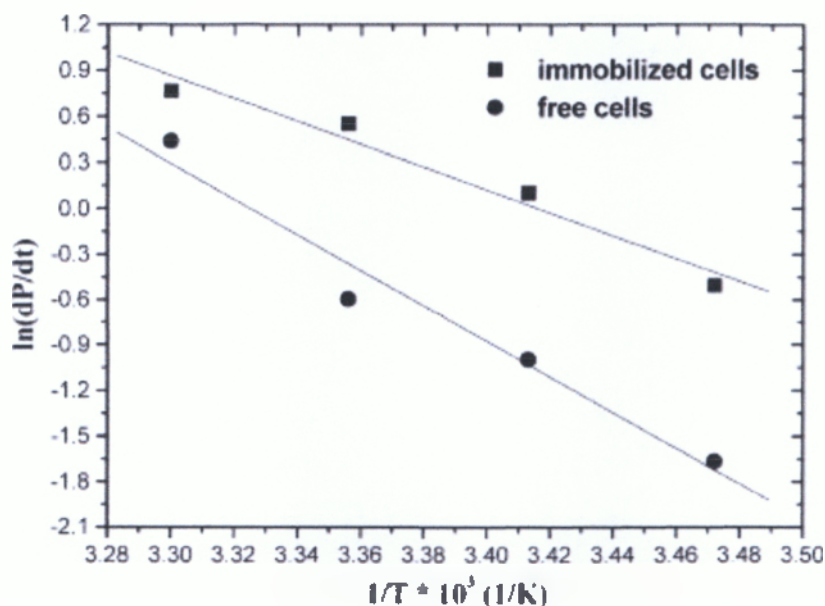
Η κινητική της ζύμωσης που παρατηρήθηκε σε 12% w/v γλυκόζη σε διάφορες θερμοκρασίες από ελεύθερα και ακινητοποιημένα σε gel αμύλου από καλαμπόκι κύτταρα παρουσιάζεται στο σχήμα 7.3. Χρησιμοποιώντας αυτά τα αποτελέσματα [υπολογισμό της παραγωγικότητας αιθανόλης (dP/dt) σε κάθε θερμοκρασία] και κάνοντας τη γραφική παράσταση του $\ln(dP/dt)$ έναντι του $1/T$, σχεδιάστηκαν οι καμπύλες του σχήματος 7.4 για ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα, και οι οποίες περιγράφονται από την ακόλουθη εξίσωση με βάση την εξίσωση *Arrhenius*:

$$\ln(dP/dt) = \ln(A) - E_a/RT$$

Η ενέργεια ενεργοποίησης E_a και οι προεκθετικοί παράγοντες *Arrhenius* για ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα υπολογίστηκαν από την κλίση και το σημείο τομής των καμπυλών αυτών. Η ενέργεια ενεργοποίησης των ακινητοποιημένων κυττάρων σε gel αμύλου καλαμποκιού ήταν 36% μικρότερη από ό,τι των ελεύθερων κυττάρων (62,2 και 97,4 kJ/mol, αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας την καταλυτική δραστηριότητα της ακινητοποίησης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την εξίσωση *Arrhenius* [$k = A \exp(-E_a/RT)$] και αντικαθιστώντας E_a και A , υπολογίστηκαν οι σταθερές ταχύτητας αντίδρασης για τα ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα σε θερμοκρασίες μεταξύ 15 και 30 °C. Η ακινητοποίηση και η θερμοκρασία επηρέασαν σημαντικά τις σταθερές ταχύτητας αντίδρασης, ενώ παρατηρήθηκε και μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά ταχύτητας αντίδρασης στους 30 °C, K_{30} , ήταν 1,8 φορές υψηλότερη από εκείνη των ελεύθερων κυττάρων (0,808 και 0,454 h⁻¹, αντίστοιχα), ενώ μία μείωση της θερμοκρασίας ζύμωσης προκλήθηκε, καθιστώντας τη σταθερά ταχύτητας αντίδρασης για τα ακινητοποιημένα κύτταρα 3,6 φορές υψηλότερη από εκείνη των ελεύθερων κυττάρων στους 15 °C (0,223 και 0,061 h⁻¹, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι το gel αμύλου δρα ως καταλύτης.



Σχήμα 7.3 Κινητική ζύμωση παρατηρήθηκε με τη χρήση του 12% w / v γλυκόζη σε 25, 20, και 15 ° C από ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης σε gel αμόλου καλαμποκιού



Σχήμα 7.4 Απεικόνιση κατά *Arrhenius* για το γραφικό υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης και του προ-εκθετικού παράγοντα της αλκοολικής ζύμωσης με ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα.

Επιστημονική και Τεχνολογική Εξέταση των Αποτελεσμάτων

Το gel αμόλου καλαμποκιού είναι ένα πολύ ενδιαφέρον υψηλής ποιότητας και καθαρότητας τρόφιμο για την ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης. Αποδείχθηκε ότι

είναι κατάλληλο για ξηρά και ημίγλυκη οινοποίηση σε 27 °C, ενώ ήταν επίσης ικανό για χαμηλής θερμοκρασίας οινοποίηση. Χρησιμοποιώντας κύτταρα ζύμης ακινητοποιημένα σε gel αμύλου καλαμποκιού, ο σχηματισμός εστέρων επιταχύνθηκε, δίνοντας μεγαλύτερα ποσά και συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τους οίνους που παράγονται από τα ελεύθερα κύτταρα. Η μείωση της θερμοκρασίας ζύμωσης (ακόμη και έως 5 °C), οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση στα ποσοστά του συνόλου των εστέρων σε σύγκριση με τις συνολικές αλκοόλες, ιδιαίτερα στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης οξικού αιθυλεστέρα και εστέρων γενικότερα σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων αυτών με την πτώση της θερμοκρασίας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τις λιγότερο έντονες ζυμώσεις που συμβαίνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες διότι η απελευθέρωση CO₂ είναι χαμηλή.

Οι έντονες ζυμώσεις στην περιοχή των 25-30 °C είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση των πτητικών εστέρων. Από την άλλη πλευρά, η μείωση των αμυλικών αλκοολών μπορεί να αποδοθεί στη μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης. Επιπλέον, η μελέτη εξέτασε κατά πόσον η αύξηση του ρυθμού ζύμωσης θα μπορούσε να αποδοθεί στα ακινητοποιημένα κύτταρα ή ήταν αποτέλεσμα της καταλυτικής δραστηριότητας του αμύλου. Για το λόγο αυτό, η ενέργεια ενεργοποίησης *E_a* και η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης τόσο για τα ελεύθερα όσο και για τα ακινητοποιημένα κύτταρα υπολογίστηκαν, επιδεικνύοντας μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης και αύξηση της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης στην περίπτωση των ακινητοποιημένων κυττάρων, ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ως εκ τούτου, το άμυλο μειώνοντας την *E_a* συμπεριφέρεται ως καταλύτης ή ως προωθητής των ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία. Επιπλέον, οποιαδήποτε βελτίωση της φυσιολογίας των κυττάρων από την ακινητοποίηση των κυττάρων που σχετίζονται με τη βελτίωση του ρυθμού της ζύμωσης θα μπορούσε να επηρεάσει το ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης. Αυτή η αύξηση του ρυθμού πρόσληψης γλυκόζης μπορεί να οφείλεται περισσότερο στην αύξηση του ρυθμού βιομετατροπής της γλυκόζης παρά στην επίδραση της βελτίωσης της φυσιολογίας των κυττάρων. Όλα αυτά δείχνουν ότι το gel αμύλου καλαμποκιού είναι ένα πολλά υποσχόμενο υπόστρωμα για την ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης στην οινοποίηση που μειώνει το χρόνο ζύμωσης και βελτιώνει τη γενική ποιότητα των οίνων αλλά και ενεργεί ως καταλύτης για τη διαδικασία, εξηγώντας την ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων για ζυμώσεις χαμηλής θερμοκρασίας. Η

καταλυτική επίδραση του gel αμύλου καλαμποκιού ανοίγει νέες προοπτικές στην έρευνα των ακινητοποιημένων κυττάρων, δείχνοντας ότι οι αυξημένες ταχύτητες ζύμωσης που λαμβάνονται γενικά με ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να οφείλονται στην καταλυτική δραστηριότητα του υποστρώματος. Ωστόσο, κάθε υπόστρωμα πρέπει να εξεταστεί χωριστά αν μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης ή όχι. Αυτή η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης οδήγησε σε αύξηση της ταχύτητας της ζύμωσης, καθιστώντας την ζύμωση σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες, με ορισμένα υποστρώματα, ελκυστική για βιομηχανικές εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1) Η μέθοδος της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Πεδίου εφαρμόστηκε για την ανάλυση και το χαρακτηρισμό σωματιδίων αμύλου προερχόμενο από διάφορα δημητριακά. Παρατηρήθηκε ότι η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του αμύλου εξαρτάται από την πηγή προέλευσης του δείγματος. Το ίδιο συμπέρασμα για την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του αμύλου προέκυψε και όταν τα ίδια δείγματα αμύλου αναλύθηκαν με τις τεχνικές της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης και της Σκέδασης Ακτινών Laser. Η πλήρης συμφωνία των αποτελεσμάτων των τριών διαφορετικών τεχνικών καθιστά τη Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου μια αξιόπιστη μέθοδο για την ανάλυση και το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό σωματιδίων αμύλου προερχόμενο από διάφορα δημητριακά.

2) Τόσο η μεταβολή του pH όσο και η μεταβολή της ιοντικής ισχύος του μέσου διασποράς του αναλυόμενου δείγματος αμύλου δεν επέφεραν μεταβολή στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του αμύλου, καθώς τόσο οι μέσες αριθμητικές όσο και οι μέσες μαζικές διαμέτροι των σωματιδίων αυτών παρέμειναν σταθερές. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι το άμυλο είναι αρκετά σταθερό στις συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης και μπορεί, από φυσικοχημικής απόψεως, να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση κύτταρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*.

3) Η χρήση υποστρώματος, όπως κόκκοι αμύλου, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης. Το γεγονός ότι (α) το άμυλο σίτου είναι ένα φθινό και διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες υλικό, (β) η διαδικασία ακινητοποίησης είναι απλή και αποτελεσματική όσον αφορά την απόδοση και την διατήρηση της ενζυματικής δραστηριότητας, (γ) η ικανότητα και η αποτελεσματικότητα του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη είναι υψηλή και (δ) από την άποψη ότι ο χειρισμός του βιοκαταλύτη και ο μηχανικός σχεδιασμός του αντιδραστήρα είναι απλός, δεδομένου ότι δεν απαιτείται ειδική αντιμετώπιση, καθιστά το άμυλο ένα πολύ ελπιδοφόρο υλικό για χρήση στη βιοτεχνολογία τροφίμων με έμφαση στην ακινητοποίηση.

4) Το gel αμύλου είναι ένα πολλά υποσχόμενο υπόστρωμα για την ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης στην οινοποίηση, καθώς μειώνει το χρόνο ζύμωσης και βελτιώνει τη γενική ποιότητα των οίνων αλλά και ενεργεί ως καταλύτης για τη διαδικασία, εξηγώντας την ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων για ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η καταλυτική επίδραση του gel αμύλου ανοίγει

νέες προοπτικές στην έρευνα των ακινητοποιημένων κυττάρων, δείχνοντας ότι οι αυξημένες ταχύτητες ζύμωσης που λαμβάνονται γενικά με ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να οφείλονται στην καταλυτική δραστηριότητα του υποστρώματος. Ωστόσο, κάθε υπόστρωμα πρέπει να εξεταστεί χωριστά αν μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης ή όχι. Η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της ζύμωσης, καθιστώντας την ζύμωση σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες, με ορισμένα υποστρώματα, ελκυστική για βιομηχανικές εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άμυλο είναι η κύρια αποθήκη πολυσακχαριτών στο φυτικό βασίλειο. Είναι η κύρια πηγή υδατανθράκων στην ανθρώπινη διατροφή και είναι μεγάλης βιομηχανικής σημασίας. Το άμυλο υπάρχει σε σωματίδια το μέγεθος, το σχήμα και η σύσταση των οποίων είναι χαρακτηριστικά της πηγής προέλευσης του αμύλου.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά μελετήθηκε η συμπεριφορά του αμύλου απέναντι στη μεταβολή διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων και προσδιορίστηκε η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του. Το άμυλο εμφανίζει υψηλή φυσικοχημική σταθερότητα, καθώς τόσο η μεταβολή του pH όσο και της ιονικής ισχύος του μέσου διασποράς δεν επηρέασαν την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την τεχνική της μονοφασικής χρωματογραφίας φυγοκεντρικού πεδίου.

Στη συνέχεια, κόκκοι αμύλου από σιτάρι χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας των σωματιδίων αμύλου στο ρυθμό αύξησης των κυττάρων καθώς και στη συνολική παραγωγή βιομάζας. Παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση των παραγόμενων κυττάρων που οδηγεί σε πολλαπλασιαστική δράση κατά την οиноποίηση.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του αμύλου στην ταχύτητα της αλκοολικής ζύμωσης και στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Το άμυλο χρησιμοποιήθηκε σε μορφή gel, πάνω στο οποίο έγινε η ακινητοποίηση των κυττάρων ζύμης με φυσική ρόφηση και μηχανική κατακράτηση. Παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου ζύμωσης και βελτίωση της γενικής ποιότητας των οίνων. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το gel αμύλου ενεργεί ως καταλύτης για τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης.

Η καταλυτική επίδραση του gel αμύλου ανοίγει νέες προοπτικές στην έρευνα των ακινητοποιημένων κυττάρων, δείχνοντας ότι οι αυξημένες ταχύτητες ζύμωσης που λαμβάνονται γενικά με ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να οφείλονται στην καταλυτική δραστηριότητα του υποστρώματος. Ωστόσο, κάθε υπόστρωμα πρέπει να εξεταστεί χωριστά αν μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης ή όχι. Η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της ζύμωσης, καθιστώντας την ζύμωση σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες, με ορισμένα υποστρώματα, ελκυστική για βιομηχανικές εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Πηγή από internet : <http://el.wikipedia.org/wiki/Αμυλο>
2. Πηγή από internet : <http://www.livepedia.gr/index.php/Αμυλο>
3. Πηγή από internet : <http://www.postokano.gr/search/node/Αμυλο>
4. J. C. Giddings, *Science*, 260, 1456 (1993).
5. H. E. Taylor, J. R. Garbarino, D. M. Murphy, R. Beckett, *Anal. Chem.*, 64, 2036 (1992).
6. K. D. Caldwell, J. Li, *Colloid Interface Sci.*, 132, 256, (1989).
7. B. N. Barman, J. C. Giddings, *Langmuir*, 8, 51 (1992).
8. J. C. Giddings, K. D. Caldwell, H. K. Jones, *Particle Size Distribution: Assessment and Characterization*, T. Provder, Ed., Acs symposium series 332, American Chemical Society, Washington, DC, 1987, Chapt. 15.
9. W. W. Yau, J. J. Kirkland, D. D. Bly, *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons, New York, 1979.
10. T. T. Lee, R. Dadoo, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 66, 2694 (1994).
11. J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, John Wiley and Sons, New York, 1991.
12. J. C. Giddings, K. D. Caldwell, *Physical Methods of Chemistry*, B. W. Rossiter, J. F. Hamilton, Eds, John Wiley and Sons, New York, 1989, Voi 3B, p.867.
13. J. C. Giddings, G. Karaiskakis, K. D. Caldwell, M. N. Myers, *J. Colloid Interface, Sci.*, 92, 66 (1983).
14. H. L. Lee, J. F. G. Reis, J. Dohner and E. N. Lightfoot, *AIChEJ*, 20, 776 (1974).
15. J. C. Giddings, *J. Chromatogr.*, 125, 3 (1976).
16. H. L. Lee and E. N. Lightfoot, *Sep. Sci.*, 11, 417 (1976).
17. J. C. Giddings, *Sep. Sci.*, 1, 123 (1966).
18. J. J. Gunderson and J.C.Giddings, *Anal. Chem.*, 59,23 (1987).
19. R. A. Ferrieri and A. P. Wolf, *Sep Sci. Technol.*, 30, 3245 (1995).
20. G. Karaiskakis and E. Dalas, *J. Chromatogr. Sci.*, 26, 29 (1988).
21. J. C. Giddings, *Science*, 260, 1456 (1993).
22. M. Martin and A. Jaulmes, *Sep. Sci. Technol.*, 16, 691 (1981).
23. M. Myers and J. C. Giddings, *Anal Chem.*, 54, 2284 (1982).
24. M. H. Moon and J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 64, 3029 (1992)
25. J. C. Giddings, *Analyst*, 118, 1487 (1993).

26. J. C. Giddings and M. N. Myers, *Sep. Sci. Technol.*, 13, 637 (1978).
27. M. Martin J. Gril. O. Besancon and R. Reynaud, *Lecture presented at the 6th Internationa Symposium on Column Liquid Chromatography*, Cherry Hill, N. J., June 19-24, 1982.
28. B. P. Ho and L. G. Leal, *J. Fluid Mech.*, 65, 365 (1974).
29. P. Vasseur and R. G. Cox, *J. Fluid Mech.*, 203, 517 (1989).
30. P. S. Williams, T. Koch and J. C. Giddings, *Chem. Eng. Comm.*, 111, 121 (1992).
31. P. S. Williams, *Sep. Sci. Technol.*, 29, 11 (1994).
32. P. S. Williams, S. Lee and J. C. Giddings, *Chem. Eng. Comm.*, 130, 143 (1996).
33. J. A. Schonberg and E. J. Hinch, *J. Fluid Mech.*, 203, 517 (1989).
34. T. Koch and J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 58, 994 (1986).
35. S. K. Ratanathanawongs and J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 64, 6 (1992).
36. K. D. Caldwell, T. T. Nguyen, M. N. Myers and J. C. Giddings, *Sep. Sci. Technol.*, 14, 935 (1979).
37. F.S. Yang, K. D. Caldwell and J. C. Giddings, *J. Colloid Interf. Sci.*, 92, 81 (1983).
38. P. Reshiglian and G. Torsi, *Chromatographia*, 40, 467 (1995).
39. J. L. Jane, T. Kasemsuwan, S. Leas, H. Zobel and J. F. Robyt, *Starch*, 46, 121 (1994).
40. M. M. MacMasters, M. J. Wolf and H. L. Seckinger, *Agric. Food Chem.*, 5 455 (1957).
41. R. A. Marsh, s. G. Waight and H. Wycombe, *Starch*, 34 149 (1982).
42. J. N. BeMiller, R. L. Whistler, *Food Chemistry*, O. R. Fennema, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, p.191.
43. H. J. Cornell, A. W. Hoveling, *Wheat: Chemistry and Utilization*, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, 1998, p.92.
44. D.A. Leathard, *New Developments in Gas Chromatography*, H. Purnell, Ed., John Wiley & Sons, Inc, New York, 1973, p.67.
45. E. Dalas and G. Karaiskakis, *Coll. Surf.*, 28, 169 (1987).
46. Α. Κολιαδήμα, *Διδακτορική Διατριβή*, Πάτρα, 1993, σελ. 76.
47. R. A. Marsh and S. G. Waight, *Starch/Stärke*, 34, 149 (1982)
48. G. Thomson, N. Kallay and E. Matijevic, *Chem. Engin. Sci.*, 38, 1901 (1983).
49. L. Farmakis, Α. Koliadima and G. Karaiskakis, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25, 167 (2002).
50. G. N. Lewis and M. Randall (Revised by K. S. Pitzer and L. Brewer),

- Thermodynamics*, 2nd edition, McGraw-Hill, New York, 1961.
51. N. A. Κατσάνος, *ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑ-ΒΑΣΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ*, Έκδοση 3^η, Αθήνα 1993.
 52. Colagrande, A. Silva & Fumi, M. D.. *Biotechnology Progress*, 10, 2–13 (1994)
 53. E. Bardi & A. Koutinas A.. *J of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 221–226. (1994).
 54. E. Bardi, V. Bakoyianis, A. Koutinas., & Kanellaki, M. *Process Biochemistry*, 31, 425–430 (1996).
 55. V. Bakoyianis, M. Kanellaki, A. Kalliafas., & A. Koutinas, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1293–1296 (1992).
 56. P. Loukatos, M. Kiaris, I. Ligas, G. Bourgos, M. Kanellaki, M. Komaitis., et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89, 1–13 (2000).
 57. A. Margaritis, & F. J. A. Merchant, *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 1(4), 339–393 (1984).
 58. Y. Kourkoutas, M. Kanellaki., A. Koutinas & Tzia, C. *Journal of Food Engineering*, 69, 115–123 (2005).
 59. S. Plessas, Y. Kourkoutas, C. Psarianos, M. Kanellaki, & A. Koutinas.. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 407–414 (2006).
 60. P. Mallios, Y. Kourkouta, M. Iconomopoulou, A. Koutinas, C. Psarianos, R. Marchant, et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1615–1623 (2004).
 61. E. Dickinson. *Trends in Food Science and Technology*, 8(10), 334–339 (1997)
 62. S. Hoffstetter Kuhn, Th. Rosler., M. Ehrat, & H. Widmer. M. *Analytical Biochemistry*, 206, 300–308 (1992).
 63. L. Farmakis, & A. Koliadima. *Biotechnology Progress*, 21(3), 971–977. (2005).
 64. E.O. Morris. In G. C. Ainsworth & A. S. Sussman (Eds.), *The fungi: an advanced treatise*. New York: Academic Press (Chapter 2). (1966).
 65. Y. Kourkoutas, A. Bekatorou., I.M. Banat, R. Marchant, & A. Koutinas. *Food Microbiology*, 21, 377–397 (2004).
 66. V. Bringi, & DE. Dale. *Biotechnology Letters*, 7, 905–908, (1985).
 67. N. Kallay, J.D. Nelligan, & E. Matijevic. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions 1*(79), 65–74 (1983).
 68. W.W. Baldwin, & H.E. Kubitschek. *Journal of Bacteriology*, 158, 701–704. (1984).

69. J.C. Giddings. *Science*, 260, 1456–1465 (1993).
70. S. Klein & H.Ziehr. *Journal of Biotechnology*, 16, 1–16 (1990).
71. J.M. Navarro, & J. Durand. *European Journal of Applied Microbiology*, 4, 243–254 (1977).
72. A. Marcipar, N. Cochet, L. Brackenridge, & J.M. Lebault. *Biotechnology Letters*, 1, 65–70 (1980).
73. P.M. Donan, & J.E.Bailey. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 73–87. (1986a).
74. Y. Kourkoutas ,A. Bekatorou, I.M. Banat, R. Marchant, A. Koutinas. *Food Microbiol.* 21, 377–397 (2004)
75. V. Bakoyiannis, M. Kanellaki, A. Kalliafas, A. Koutinas. *Agric. Food Chem.*, 40, 1293–1296 (1992)
76. P. Loukatos, M. Kiaris, I. Ligas, G Bourgos, Kanellaki, M. Komaitis, A. Koutinas, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 89, 1–13 (2000)
77. G. Suzzi, P. Romano, L. Vannini, L. Turbanti, P. Domizio,. *World. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 25–27 (1996)
78. M. F. M. Van Iersel, B. Van Dieren, F.M. Rombouts, T. Abee, *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 407–411 (1999)
79. M. Kosseva, V. Beschkov, J.F. Kennedy, L.L. Lloyd. *Process Biochem.* 1998, 33, 793–797.
80. A. Crapisi, P. Spettoli, M.P. Nuti, A.J. Zamorani. *Appl. Bacteriol.*, 63, 513–521. (1987)
81. E. Bardi ,A.A.J. Koutinas,. *Agric. Food Chem.* 1994, 42, 221–226.
82. M. Iconomopoulou, K. Psarianos, M. Kanellaki, A.A. Koutinas. *Process Biochem.*, 37, 707–717 (2002)
83. N. Kopsahelis M. Kanellaki, A. Bekatorou. *Food Chem.*, 104, 480–488 (2007)
84. A. Bekatorou, A.Sarellas, N.G. Terman, A. Mallouchos,M. Komaitis, A.A. Koutinas, M. Kanellaki, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7249–7257 (2002)
85. A. Tsakiris, A. Bekatorou, C. Psarianos, A.A. Koutinas. R. Marchant, I.M. Banat *Food Chem.*, 87, 11–15 (2004)
86. Y. Kourkoutas, M. Kanellaki, A.A. Koutinas C.J. Tzia. *Food Eng.*, 69, 115–123. (2005)
87. P. Kandyliis, A.A. Koutinas, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3317–3327 (2008)
88. E. Bardi, A.A. Koutinas, M. Soupioni, M. Kanellaki. *Agric. Food Chem.*, 44, 463–467 (1996)

89. R.S. Jackson. *Wine Science: Principles and Applications* Academic Press: San Diego, CA, 1994; pp 184-187.
90. J.A. Regodon Mateos, F. Perez-Nevaldo, M. Ramirez Fernandez, *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 151–157 (2006)
91. P. Riberau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu. *The chemistry of wine stabilization and treatments*. In *Handbook of Enology*; Wiley: Chichester, U.K., 2000; Vol. 2, pp 41-54, 189,193- 196.
92. A. RappMandery, H. *Experientia*, 42, 873–884 (1986)
93. R. Vidrih, J. Hribar. *Food Chem.*, 67, 287–294 (1999)
94. Etievant, X. P. *Wine*. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages*; MaarseH., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1991; pp 483-533.
95. A. Mallouchos, M. Komaitis, A.A. Koutinas, M. Kanellaki. *Agric. Food Chem.*, 50, 3840–3848 (2002)
96. A.F. Pisarnitskii. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 37, 552–560 (2001)
97. M. Vilanova, C.J. Sieiro. *Food Compos. Anal.*, 19,694–697 (2006)
98. A. Pena-Alvarez, S. Capella, R. Juarez, Labastida, C.. *J. Chromatogr., A*, 1134, 291–297 (2006)