



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΖΥΘΟΠΟΙΙΑΣ»

Διπλωματική Εργασία

Τσαρουχά Χρυσούλα

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Κροκίδα Μαγδαληνή

Αθήνα, Οκτώβριος 2021

Στη μπέμπα μας και τη γιαγιά μας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μαγδαληνής Κροκίδα, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου υπέδειξε για την ανάθεση του θέματος.

Η εκπόνηση της εργασίας, δε θα ήταν εφικτή δίχως την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη στήριξη των ανθρώπων που απαρτίζουν το εργαστήριο. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Διδάκτορες Βασιλική Οικονομοπούλου και Σοφία Παπαδάκη για όλον το χρόνο που αφιέρωσαν για να με καθοδηγήσουν, παρά το μεγάλο φόρτο εργασίας τους, αλλά και την καλή τους διάθεση να με νουθετούν, να με κάνουν να νιώθω καλά μέσα στο περιβάλλον του εργαστηρίου και να βρίσκουν λύση σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυψε, χωρίς την οικεία παρουσία τους και τις πολύτιμες γνώσεις τους, δε θα μπορούσα να εργαστώ αποτελεσματικά. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Μαργαρίτα Παναγιωτοπούλου για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε και την προθυμία της να μου συστήσει το εργαστήριο. Μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης και σε ένα ένα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου (Μπουκουβάλα Χρήστο, Ελένη Παναγιώτα, Δρόσου Χριστίνα, Στραμάρκου Μαρίνα, Πάππου Σοφία, Μάρη Αλεξάνδρα, Κριτσωτάκη Κωνσταντίνο, Κοσκινάκη Σωκράτη) οι οποίοι μου πρόσφεραν μία εξαιρετική συνεργασία και την ευκαιρία να μη διστάζω να εκφράζω όποια απορία έχω. Αμέριστη ήταν όμως και η συμπαράσταση που έλαβα από τη Διδάκτορα Όλγα Σερίφη και την Υποψήφια Διδάκτορα Λαϊνά Κωνσταντίνα, οι οποίες με τις συζητήσεις μας με καθυσύχάζαν και από τις οποίες αντλούσα πολλές γνώσεις.

Μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επιπλέον και στον Καθηγητή Ευάγγελο Τόπακα και στα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Η ευγνωμοσύνη μου είναι μεγάλη και για τους ανθρώπους της ζωής μου, τους γονείς μου, τα αδέρφια μου, τους θείους μου που ήταν πάντα παρόντες, αποτελούσαν το στήριγμα για να προχωρώ και με υπέμειναν μαζί με όλες τις παραξενιές μου. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου για όλες αυτές τις ώρες διαβάσματος, της βοήθειας και των όμορφων στιγμών που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ντίνο ο οποίος είναι ο άνθρωπος που με «σήκωνε» κάθε φορά που «έπεφτα» στο δρόμο της εκπόνησης της διπλωματικής μου.

Αθήνα, 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της απομόνωσης πρωτεϊνών από παραπροϊόντα ζυθοποιίας με στόχο τη δημιουργία πρωτεϊνούχων εκχυλισμάτων που δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων.

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής και η αναγκαιότητα κάλυψης των διατροφικών αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού σε πρωτεΐνες σε συνδυασμό με την τάση υιοθέτησης ενός vegan τρόπου ζωής, οδηγούν στη μελέτη απομόνωσης πρωτεϊνών από εναλλακτικές πηγές όπως είναι τα παραπροϊόντα του αγροδιατροφικού τομέα. Τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας της ζυθοποιίας είναι πλούσια πηγή φυτικών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού (BSG) κατά μέσο όρο εμπεριέχουν 20% πρωτεΐνες ανά ξηρό βάρος, ενώ τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς (BSY) 50% σε ξηρό βάρος. Οι πρωτεΐνες είναι βιομόρια χρήσιμα τόσο εξαιτίας της θρεπτικής τους αξίας όσο και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού μελετάται η επίδραση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, η συμβατική εκχύλιση υπό θέρμανση και ανάδευση, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα. Στις δύο πρώτες εξετάζεται η χρήση τριών διαφορετικών διαλυτών, NaOH 0,1 M, Ethanol/NaOH (45:55) και Methanol/NaOH (45:55). Στις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους μελετάται η επίδραση δύο διαφορετικών αναλογιών στερεής βιομάζας διαλύτη 1:10 και 1:20, τριών διαφορετικών τιμών ισχύος υπερήχων 150 W, 450 W και 750 W και τριών χρόνων εκχύλισης 5, 10 και 20 λεπτά. Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα χρησιμοποιείται το ένζυμο Alcalase 2,4 L και εξετάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου για συγκεντρώσεις 10 mg και 20 mg, ο χρόνος της εκχύλισης 6, 12 και 24 ώρες και η χρήση BSG που έχουν υποστεί κατεργασία με τη βοήθεια υπερήχων και ακατέργαστων BSG. Επιπλέον μελετάται και η επίδραση των τριών προαναφερθέντων διαλυτών αλλά και η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών στην απομόνωση πρωτεϊνών από τα κύτταρα της εξαντλημένης μαγιάς με τη χρήση συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους. Εκτός των παραπάνω πραγματοποιούνται μετρήσεις σχετικές με την αξιολόγηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων που παραλαμβάνονται από τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους των BSG. Συγκεκριμένα οι αναλύσεις που πραγματοποιούνται είναι η κατανομή μεγέθους σωματιδίων και η ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου.

Για το διαλύτη NaOH 0,1 M αποδεικνύεται πως η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους οδηγεί σε παρόμοια και καλύτερα αποτελέσματα απομόνωσης πρωτεϊνών εν συγκρίσει με τις συμβατικές εκχυλίσεις, αποδόσεις που εξασφαλίζονται σε μικρότερο χρόνο και χωρίς την παρουσία θερμότητας με τις βέλτιστες συνθήκες να είναι: αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη 1:20, ισχύς υπερήχων 750 W και χρόνος εκχύλισης 20 λεπτά, οδηγώντας στην απομόνωση $61,39 \pm 5,21$ mg πρωτεΐνης/ g BSG. Για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), παρατηρείται πως η αναλογία 1:10 στερεής βιομάζας-διαλύτη εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις στις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους όπως επίσης και στις αποδόσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου των συμβατικών εκχυλίσεων. Η καλύτερη συνθήκη εντοπίζεται για ισχύ 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά στην αναλογία 1:10 και διαμορφώνεται στην τιμή $20,14 \pm 2,25$ mg πρωτεΐνης/g BSG. Στην περίπτωση του διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) ομοίως φαίνεται πως η αναλογία 1:10 οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις όσον αφορά στις συμβατικές εκχυλίσεις, ενώ η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους δεν παρουσιάζει θετική επίδραση στην απομόνωση πρωτεϊνών σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση, με μοναδική συνθήκη να προσεγγίζει

περισσότερο τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης εκείνη για αναλογία 1:10 και ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο 20 λεπτά. Όσον αφορά στις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με ένζυμα, η χρήση των ακατέργαστων BSG οδηγεί συνολικά και για τους τρεις χρόνους εκχύλισης σε καλύτερες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Επιπλέον παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης συμβάλλει στην αύξηση της απομόνωσης των πρωτεϊνών, με την εκχύλιση των 24 ωρών να οδηγεί σε απομόνωση 20,15 mg πρωτεΐνης/g BSG. Τέλος, αποδεικνύεται πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση αλκαλάσης δε συμβάλλει θετικά στην αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG. Όσον αφορά στις εκχυλίσεις της BSY παρατηρείται πως οι συμβατικές εκχυλίσεις οδήγησαν σε χαμηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο εξαιτίας του μεγάλου χρόνου κατεργασίας, ενώ η μεγαλύτερη απόδοση σε πρωτεΐνη λαμβάνεται για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και διαλύτη NaOH 0,1 M με απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο 35,84 mg πρωτεΐνης/ g BSY και αμέσως πιο αποδοτικός διαλύτης αποδεικνύεται Methanol/NaOH (45:55) και οδηγεί σε απομόνωση 32,39 mg πρωτεΐνης /g BSY. BSY. Τέλος τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους, παρουσιάζουν βελτιωμένες λειτουργικές ιδιότητες, γεγονός που τα καθιστά αξιοποιήσιμα στο πεδίο της βιομηχανίας τροφίμων.

ABSTRACT

The purpose of this diploma thesis is to study the isolation of proteins from brewing by-products in order to obtain extracts that can be used in food industry.

The modern way of living and the necessity of dealing with the nutritional needs in proteins for the world population combined with the tendency to adopt a vegan lifestyle, lead to the study of proteins' isolation from alternative sources, such as the by-products of the agro-industrial sector. By-products of brewing industry are rich in proteins and more specifically brewer's spent grains (BSG) contain about 20% of proteins and brewers' spent yeast (BSY) contain about 50% on dry base. Proteins are useful biomolecules because of both their nutritional value and their functional properties.

In this work, for the isolation of proteins from BSG, the effect of three different extraction methods is studied: conventional extraction, ultrasound assisted extraction and enzymatic assisted extraction. In the conventional extraction and ultrasound assisted extraction the use of three different solvents is examined: NaOH 0,1 M, Ethanol/NaOH (45:55) and Methanol/NaOH (45:55). In the ultrasound assisted extraction the effect of two different biomass to solvent ratio 1:10 and 1:20, three different ultrasound powers 150 W, 450 W and 750 W and three extraction times 5, 10 and 20 minutes are evaluated. In the enzymatic assisted extraction the enzyme Alcalase 2,4L is used and the effect of enzyme loadings at 10 mg and 20 mg, the extraction times for 6, 12, 24 hours and the use of ultrasound pretreated BSG and crude BSG are examined. In addition the effect of use the three mentioned above solvents for the isolation of proteins from BSY is studied, using both conventional and ultrasound assisted extraction. Also measurements are made in order to evaluate the functional properties of the extracts obtained from conventional and ultrasound assisted extraction of BSG. Specifically particle size distribution and water and oil absorption capacity are studied.

The use of NaOH 0,1 M in ultrasound assisted extraction leads to similar and better results of protein content in less time and without use of heat, compared to conventional extraction. The optimum conditions are: 1:20 biomass to solvent ratio, ultrasound power 750 W and extraction time 20 minutes, leading to isolation of $61,39 \pm 5,21$ mg protein-g BSG. The use of Ethanol/NaOH (45:55) in 1:10 biomass to solvent ratio leads to higher yields in the ultrasound assisted extraction, as well as higher yields of protein content in conventional extraction. The optimum condition of UAE is 450 W power and 20 minutes extraction time in ratio 1:10 and is calculated at $20,14 \pm 2,25$ mg protein/g BSG. Methanol/NaOH (45:55) in ultrasound assisted extraction does not lead to positive effect on protein isolation compared to conventional extraction in which 1:10 biomass to solvent ratio seems better. In the case of enzymatic assisted extraction, the use of crude BSG leads to a better protein yield for all the studied extraction times. In addition, it is observed that the increase of the extraction time contributes to the increase of the protein isolation. The maximum yield of protein per gram of BSG is observed for 24 hours extraction leading to isolation of 20,15 mg protein/g BSG. The higher enzyme loading does not contribute positively to the increase of the protein content per gram of BSG. Regarding the extraction of BSY, it is observed that the conventional extraction leads to lower protein content due to the longer processing time. Highest protein yield is obtained for the ultrasound assisted extraction using NaOH 0,1 M as a solvent with a protein content of 35,84 mg protein/g BSY and the next more efficient solvent is Methanol/NaOH (45:55) and leads to isolation of 32,39 mg protein/ g BSY. Finally, the extracts of UAE have improved functional properties.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	13
1.1 Σπατάλη και Απώλεια Τροφίμων.....	13
1.1.1 Κάλυψη Διατροφικών Αναγκών.....	13
1.1.2 Ορισμός Σπατάλης Τροφίμων-Απωλειών Τροφίμων	13
1.1.3 Σπατάλη Τροφίμων στα Στάδια της Εφοδιαστικής Αλυσίδας-Πηγές Προέλευσης	14
1.2 Διαχείριση και Αξιοποίηση Παραπροϊόντων.....	15
1.3 Ανάκτηση Συστατικών Προστιθέμενης Αξίας από Παραπροϊόντα.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ	18
2.1 Ιστορία Μπύρας.....	18
2.2 Πρώτες Ύλες για την Παραγωγή Μπύρας.....	18
2.2.1 Νερό	18
2.2.2 Κριθάρι/Βύνη	19
2.2.3 Λυκίσκος	20
2.2.4 Μαγιά.....	21
2.3 Διεργασίες Παραγωγής Μπύρας.....	21
2.3.1 Συγκομιδή Κριθαριού	21
2.3.2 Προεπεξεργασία	22
2.3.3 Βυνοποίηση	23
2.3.4 Ζυθοποίηση	24
2.3.5 Ζύμωση	25
2.3.6 Μεταζυμωτικές Ενέργειες	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΖΥΘΟΠΟΙΙΑΣ	27
3.1 Εξαντλημένοι Σπόροι Κριθαριού(Brewers' Spent Grain).....	27
3.1.1 Παραγωγή	27
3.1.2 Χημική Σύσταση	28
3.1.3 Συντήρηση-Αποθήκευση	30
3.1.4 Αξιοποίηση-Επεξεργασία.....	30
3.2 Μαγιά.....	32

3.2.1 Παραγωγή	33
3.2.2 Χημική Σύσταση	34
3.2.3 Αξιοποίηση-Επεξεργασία.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΥΘΟΠΟΙΙΑΣ.....	38
4.1 Ξήρανση Πρώτης Ύλης	38
4.1.1 Τύποι Ξηραντήρων.....	38
4.1.2 Ξήρανση Υπό Κατάψυξη-Λυοφιλίωση.....	39
4.2 Εκχύλιση Στερεών με Υγρό Διαλύτη	39
4.2.1 Αρχές και Μηχανισμοί Εκχύλισης Στερεού-Υγρού	40
4.2.2 Χημική Εκχύλιση Πρωτεϊνών	41
4.2.3 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους	41
4.2.4 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Ένζυμα	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
5.1 Προεπεξεργασία Εξαντλημένων Σπόρων Κριθαριού (BSG).....	45
5.1.1 Ξήρανση Υπό Κατάψυξη - Λυοφιλίωση	45
5.1.2 Άλεση BSG.....	46
5.1.3 Απολίπανση BSG	46
5.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από BSG	47
5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση.....	47
5.2.2 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους UAE.....	48
5.2.3 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Ένζυμα EAE	49
5.3 Παραλαβή ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από συμβατικές εκχυλίσεις και εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους UAE.....	51
5.3.1 Φυγοκέντρηση	51
5.3.2 Καταβύθιση πρωτεϊνών.....	52
5.3.3 Επαναδιάλυση καταβυθισμένου στερεού υπολείμματος	54
5.4 Μέτρηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου.....	55
5.4.1 Παρασκευή Διαλύματος Χρωστικής BrilliantBlueG	55
5.4.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα ξηρά εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων και των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους	57
5.4.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με ένζυμα.....	58
5.5 Προεπεξεργασία υπολειμμάτων εξαντλημένης μαγιάς BSY	59
5.5.1 Απομάκρυνση υπολειμμάτων μύρας	59
5.5.2 Υπολογισμός περιεχόμενης υγρασίας στα κύτταρα της μαγιάς	60
5.5.3 Εκχυλίσεις πρωτεϊνών από υπολείμματα εξαντλημένης μαγιάς BSY	60

5.5.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων της BSY ...	61
5.6 Αναλύσεις Λειτουργικών Ιδιοτήτων Ξηρών Πρωτεϊνικών Εκχυλισμάτων.....	61
5.6.1 Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution)	62
5.6.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού και Ελαίου (Water and Oil Absorption Capacity)	63
5.7 Κωδικοποίηση Παραμέτρων Πειράματος	63
5.8 Στατιστική επεξεργασία	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° : ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	65
6.1 Απόδοση εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα BSG μετά την καταβύθιση.....	65
6.1.1 Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος συμβατικών εκχυλίσεων BSG	65
6.1.2 Αποδόσεις ξηρού εκχυλίσματος εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για τα BSG	66
6.2 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου συμβατικών εκχυλίσεων και εκχυλίσεων UAE για τα BSG	73
6.2.1 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG συμβατικών εκχυλίσεων.....	73
6.2.2 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους	75
6.3 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με ένζυμο	81
6.4 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου για τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για τη BSY.....	82
6.5 Μετρήσεις Λειτουργικών Ιδιοτήτων.....	83
6.5.1 Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution).....	84
6.5.2 Μέτρηση Ικανότητας Συγκράτησης Νερού και Ελαίου (Water and Oil Absorption Capacity)	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Χημική Σύσταση των Εξαντλημένων Σπόρων Κριθαριού BSG (g ανά 100g ξηρής ύλης BSG)	29
Πίνακας 2. Χημική Σύσταση των Υπολειμμάτων Εξαντλημένης Μαγιάς (BSY) και εκχυλισμάτων μαγιάς (g ανά 100g ξηρής ύλης BSY)	35
Πίνακας 3. Κωδικοποίηση μεθόδων και παραμέτρων	63
Πίνακας 4. Απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο συμβατικών εκχυλίσεων BSG	73
Πίνακας 5. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:10	75
Πίνακας 6. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:20	76
Πίνακας 7. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10	77
Πίνακας 8. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20	78
Πίνακας 9. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10	79
Πίνακας 10. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20	80
Πίνακας 11. Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη NaOH 0,1 M	87
Πίνακας 12. Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)	87
Πίνακας 13. Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ποσοστιαία παραγωγή αποβλήτων στους τομείς της εφοδιαστικής αλυσίδας [5]	14
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής δομής του κόκκου κριθαριού [14]	19
Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής δημιουργίας BSG [15]	28
Εικόνα 4. Διάγραμμα ροής δημιουργίας παραπροϊόντων ζυθοποιίας [35]	34
Εικόνα 5. Στάδια εκχύλισης συστατικού από στερεά σωματίδια με τη χρήση διαλύτη [42]	40
Εικόνα 6. Πειραματική διάταξη για εφαρμογή UAE [47]	42
Εικόνα 7. Διάταξη ξήρανσης υπό κατάψυξη LEYBOLD–HERAEUS FREEZE–DRYER GT2	45
Εικόνα 8. Πορεία προεπεξεργασίας BSG	46
Εικόνα 9. Θάλαμος Υπερήχων-Μικροκυμάτων (Ultrasonic Microwave Reaction System)	49
Εικόνα 10. Alcalase 2.4 L	51
Εικόνα 11. Διάταξη φυγοκέντρου (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)	52
Εικόνα 12. Εκχύλισμα πρωτεϊνών προερχόμενων από τα BSG πριν την καταβύθιση	53
Εικόνα 13. Ρυθμισμένη τιμή pH εκχυλίσματος στο ισοηλεκτρικό σημείο	54
Εικόνα 14. Ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από BSG	55
Εικόνα 15. Διήθηση διαλύματος BrilliantBlueG	56
Εικόνα 16. Φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy)	57
Εικόνα 17. Αλλαγή χρώματος δειγμάτων ύστερα από την προσθήκη του διαλύματος Bradford	58
Εικόνα 18. Κύτταρα υπολειμμάτων μαγιάς	59
Εικόνα 19. Αναλυτής κατανομής μεγέθους σωματιδίων (Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer)	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Απόδοσεις συμβατικών εκχυλίσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση	65
Διάγραμμα 2. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:10 .	66
Διάγραμμα 3. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:20 .	67
Διάγραμμα 4. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10	69
Διάγραμμα 5. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20	70
Διάγραμμα 6. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10	71
Διάγραμμα 7. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20	72
Διάγραμμα 8. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG της ΕΑΕ για χρήση BSG μετά από επεξεργασία με χρήση υπερήχων	81
Διάγραμμα 9. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG της ΕΑΕ για χρήση BSG χωρίς επεξεργασία με χρήση υπερήχων	82
Διάγραμμα 10. Απόδοση πρωτεϊνικού ανά γραμμάριο BSY συμβατικών εκχυλίσεων και UAE.....	83
Διάγραμμα 11. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη NaOH 0,1 M...	84
Διάγραμμα 12. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE με διαλύτη NaOH 0,1 M	84
Διάγραμμα 13. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)	85
Διάγραμμα 14. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE με διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)	85
Διάγραμμα 15. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)	86
Διάγραμμα 16. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1 Σπατάλη και Απώλεια Τροφίμων

1.1.1 Κάλυψη Διατροφικών Αναγκών

Η διατροφή αποτελεί μία από τις θεμελιώδεις ανάγκες του ανθρώπου. Οι διατροφικές ανάγκες και συνήθειες του ανθρώπου, όμως, καθώς επίσης και η διαχείριση των τροφίμων από την παραγωγή τους ως και την απόρριψή τους με τη μορφή των αποβλήτων, καθιστούν το σύστημα διαχείρισης τροφίμων περίπλοκο. Ως εκ τούτου, το σύνολο των διαδικασιών, που λαμβάνουν μέρος στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών, έχουν άμεσο αντίκτυπο στον άνθρωπο, το περιβάλλον, την οικονομία και συνολικά πλέον στην κοινωνία. [1]

Οι σύγχρονες συνθήκες ζωής έχουν καθορίσει τη διατροφική συμπεριφορά του ανθρώπου, καθώς προσφέρουν πιο άμεση πρόσβαση στα τρόφιμα εξαιτίας της παρουσίας των υπεραγορών και των αλυσίδων παροχής γρήγορου φαγητού, όπως επίσης, έχουν βοηθήσει στην οικονομική ευμάρεια. Οι δύο αυτές συνθήκες συντελούν στο να έχει ο άνθρωπος περισσότερη πρόσβαση στο φαγητό, περισσότερες επιλογές γεύσεων και κατ' επέκταση να οδηγείται σε μεγαλύτερη σπατάλη τροφής. [2]

1.1.2 Ορισμός Σπατάλης Τροφίμων-Απωλειών Τροφίμων

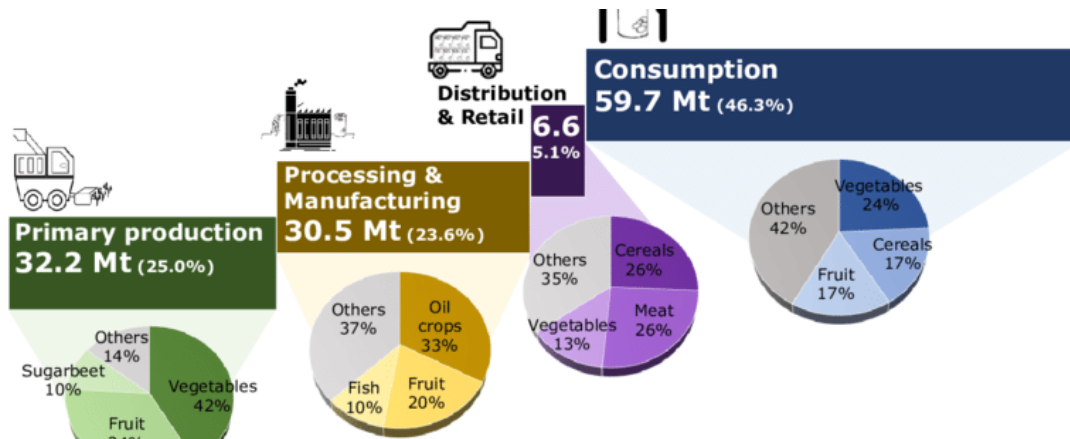
Κατά την κατανάλωση τροφίμων από τους καταναλωτές, στον τομέα της εφοδιαστικής αλυσίδας και της εστίασης, αλλά και κατά το στάδιο της γεωργικής παραγωγής και κατά τη βιομηχανική επεξεργασία τους, προκύπτει ένας μεγάλος όγκος παραπροϊόντων και αποβλήτων, ο οποίος οδηγεί στο φαινόμενο της σπατάλης τροφίμων (food waste). Δεδομένου ότι τα «απορρίμματα» των τροφίμων συγκροτούν μία πηγή προϊόντων, των οποίων τα συστατικά έχουν χαμηλότερη οικονομική αξία από τη διαδικασία συλλογής και ανάκτησής τους, οδηγούνται να χαρακτηρίζονται ως απόβλητα. Ως απώλειες τροφίμων, χαρακτηρίζεται το φαινόμενο του συνόλου των τροφίμων, τα οποία τυχαία απορρίπτονται ως παραπροϊόντα [3] και προκύπτουν σε όλα τα στάδια της εφοδιαστικής αλυσίδας (παραγωγή, μεταποίηση, συσκευασία, διακίνηση, κατανάλωση).

Συνολικά, οι απώλειες τροφίμων διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- i. Απόβλητα τροφίμων, χαρακτηρίζονται τα προϊόντα-τμήματα των τροφίμων τα οποία στο στάδιο της παραγωγής «χάνονται» ως απώλειες (μη αποδεκτά τρόφιμα προς κατανάλωση)
- ii. Αναπόφευκτα παραγόμενα απόβλητα τροφίμων, συγκροτούν το σύνολο των προϊόντων-τμημάτων των τροφίμων που κατά την κατανάλωση του φαγητού ή τη βιομηχανική επεξεργασία τους απορρίπτονται, όπως για παράδειγμα φλούδες, περιβλήματα, πυρήνες
- iii. Παραγόμενα απόβλητα τροφίμων που θα μπορούσαν να αποφευχθούν, τα οποία είναι το σύνολο των τροφίμων που στο στάδιο της κατανάλωσης, «χάνονται», ενώ θα μπορούσαν να είχαν καταναλωθεί δίχως αναγκαιότητα απόρριψής τους [4]

Λαμβάνοντας υπόψιν την έρευνα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το έτος 2020 ο ετήσιος όγκος των αποβλήτων τροφίμων, ανέρχεται σε 129 εκατομμύρια τόνους. [5] Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1,

το 23,6% των παραγόμενων αποβλήτων τροφίμων, δημιουργούνται στο στάδιο της βιομηχανικής παραγωγής και το 46,3% κατά την κατανάλωση φαγητού σε οικιακό επίπεδο.



Εικόνα 1. Ποσοστιαία παραγωγή αποβλήτων στους τομείς της εφοδιαστικής αλυσίδας [5]

1.1.3 Σπατάλη Τροφίμων στα Στάδια της Εφοδιαστικής Αλυσίδας-Πηγές Προέλευσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ποσότητες των τροφίμων που καταλήγουν είτε ως απώλειες είτε ως απόβλητα των τροφίμων, προκύπτουν κιόλας από το στάδιο του αγροτικού τομέα (καλλιέργεια, συγκομιδή, κτηνοτροφία), ως και το στάδιο της κατανάλωσης (νοικοκυριό, εστίαση, υπηρεσίες διανομής φαγητού). Γίνεται λοιπόν σαφές πως το φαινόμενο της σπατάλης σε παγκόσμιο επίπεδο χωρίζεται στις ακόλουθες κατηγορίες προέλευσης:

- ❖ Πρωτογενής Τομέας (γεωργία, κτηνοτροφία, καλλιέργεια)
- ❖ Τομέας μεταποίησης (βιομηχανία τροφίμων)
- ❖ Τομέας Διανομής και Πώλησης
- ❖ Τομέας τελικής κατανάλωσης (νοικοκυριό, υπηρεσίες εστίασης)

Όσον αφορά στο φαινόμενο της απώλειας τροφίμων κατά το πρώτο στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας, δηλαδή τον αγροτικό τομέα, οι απώλειες ξεκινούν ήδη από την καλλιέργεια των γεωργικών προϊόντων. Ένας παράγοντας που οδηγεί σε απώλειες είναι η επίδραση στην καλλιέργεια ζιζανίων, εντόμων ή και ακόμη οι επιδρομές ζώων που είτε τρώνε καρπούς είτε απλώς και μόνο προκαλούν φθορές στην καλλιέργεια. Επιπλέον, απώλειες εμφανίζονται και λόγω έλλειψης γνώσεων και τεχνογνωσίας, σχετικά με τις καλλιεργητικές τεχνικές που μπορούν να αποβούν ζημιογόνες για την καλλιέργεια. [6] Επιπρόσθετα, τα καλλιεργήσιμα είδη αναπτύσσονται σε περιβαλλοντικές-κλιματικές συνθήκες, τέτοιες που πολλές φορές οδηγούν στην εμφάνιση απωλειών, εξαιτίας καιρικών συνθηκών, μολύνσεων και ασθενειών. Τέλος, στο στάδιο της συγκομιδής, ενέργειες όπως είναι η διαλογή, η αποθήκευση, η συσκευασία και η μεταφορά, ενέχουν τον κίνδυνο μέρος της παραγωγής να απορριφθεί ως ακατάλληλο για ποιοτικούς, μορφολογικούς λόγους κ.α.

Το δεύτερο στάδιο της μεταποίησης περιλαμβάνει τη βιομηχανική επεξεργασία των προϊόντων. Σε αυτό το στάδιο περιλαμβάνονται ενέργειες όπως είναι η μετατροπή των αγροτικών προϊόντων σε βρώσιμα τρόφιμα. Η μετατροπή αυτή οδηγεί στην παρουσία υπολειμμάτων λόγω της επεξεργασίας των πρωτογενών πρώτων υλών με τελικό στόχο τη δημιουργία μεταποιημένων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, διεργασίες όπως είναι το πλύσιμο, το μαγείρεμα, η ανάμειξη, η ξήρανση, η άλεση, η απόσταξη κ.τ.λ. οδηγούν στη δημιουργία υπολειμμάτων που αποτελούν τις απώλειες της βιομηχανίας τροφίμων. Παράλληλα, αδυναμίες που προκύπτουν στο στάδιο της μεταποίησης και

σχετίζονται με τη συσκευασία, τη μεταφορά ύστερα από το στάδιο της συγκομιδής από τον αγρό στο σημείο διανομής, την υποβάθμιση της ποιότητας των πρώτων υλών μέχρι τη βιομηχανική τους χρήση, επίσης, συντελούν στη δημιουργία του όγκου των παραπροϊόντων στον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων. [3], [6] Τα υπολείμματα και τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από τη βιομηχανία τροφίμων, περιέχουν πολύτιμα βιοδραστικά συστατικά που μπορούν να ενταχθούν σε τρόφιμα ως ενισχυτικά και να αποτελέσουν εναλλακτικές πηγές άντλησης αυτών. [7]

Εν συνεχεία, φτάνοντας τα βρώσιμα προϊόντα στο επίπεδο της διανομής και της πώλησης (λιανική-χονδρική), εξ' αιτίας των προτύπων ποιότητας, αισθητικής, ασφάλειας και στρατηγικών μάρκετινγκ που εφαρμόζονται από τις εταιρείες που τα εμπορεύονται, είναι πιθανό μεγάλες ποσότητες να οδηγηθούν σε απόρριψη ως απώλειες. Η ποιοτική ή οργανοληπτική υποβάθμιση των προϊόντων προκύπτει από τις συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς, από τη λανθασμένη εκτίμηση των πρόσκαιρων αναγκών των καταναλωτών και από τις διαδικασίες εφοδιασμού. [3], [6]

Στο τελευταίο στάδιο, αυτό της κατανάλωσης, οι απώλειες των τροφίμων που προκύπτουν, συγκροτούν το μεγαλύτερο μέρος παραγωγής αυτών, όπως προκύπτει παρατηρώντας την Εικόνα 1. Κατά την κατανάλωση των τροφίμων οι αιτίες που έρχονται να προστεθούν ως παράγοντες αφορούν κυρίως στη συμπεριφορά και τις ανάγκες του καταναλωτικού κοινού. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη γνώσεων σχετικά με το φαινόμενο της σπατάλης τροφίμων και των επιπτώσεων του στο περιβάλλον, καθιστά τους καταναλωτές λιγότερο ευαίσθητους ως προς τις ποσότητες τροφίμων που αγοράζουν, μαγειρεύουν, διαθέτουν στις υπηρεσίες και εν τέλει δεν καταναλώνουν. Επιπλέον, η ελλιπής γνώση διαχείρισης των εναπομείναντων ποσοτήτων φαγητού και η ποιοτική τους υποβάθμιση, λόγω της αμέλειας που επιδεικνύουν, καθυστερούν την ενδεχόμενη επαναχρησιμοποίησή τους (χρήση για κομποστοποίηση, ως συμπληρωματικές ζωοτροφές κ.τ.λ.) και οδηγούν στην απόρριψή τους. [8]

1.2 Διαχείριση και Αξιοποίηση Παραπροϊόντων

Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαχείρισης των αποβλήτων, που προέρχονται από την επεξεργασία των τροφίμων, είναι η χρήση τους ως ζωοτροφές. Παραπροϊόντα που είναι εμπλουτισμένα με λιπίδια και πρωτεΐνες είναι ιδανικές ζωοτροφές για ζώα παμφάγα, ενώ παραπροϊόντα πλούσια σε κυτταρίνη ενδείκνυνται για μηρυκαστικά.

Μία ακόμη συνήθης στρατηγική διαχείρισης των παραπροϊόντων, που προέρχονται από τη βιομηχανία τροφίμων, είναι η υγειονομική ταφή, αφού είναι μια οικονομική επιλογή για τη διάθεση των στερεών αποβλήτων. Η υγειονομική ταφή ορίζεται ως η διάθεση, η συμπίεση και η επιχωμάτωση τους σε σημεία κατάλληλα, περιλαμβάνοντας τα στάδια της υδρόλυσης/αερόβιας υποβάθμισης, της υδρόλυσης/ζύμωσης, της ακετογένεσης και της μεθανογένεσης. Πάραυτα, οι κυβερνήσεις προβαίνουν σε σειρά μέτρων όπως είναι οι διατάξεις, μέτρα φορολογίας και δημόσιας επίγνωσης προκειμένου να μειώσουν τη χρήση της υγειονομικής ταφής ως μέτρο διαχείρισης.

Παράλληλα, άλλος τρόπος διαχείρισης των βιομηχανικών αποβλήτων, είναι η κομποστοποίηση, διαδικασία που περιλαμβάνει την αερόβια υποβάθμιση των οργανικών συστατικών μέσω της επίδρασης μικροοργανισμών, προς δημιουργία προϊόντων υψηλής σταθερότητας. Η διαδικασία της κομποστοποίησης, συμβάλει στη δημιουργία λιπάσματος που προσδίδει στο έδαφος βελτιωμένες δομικές ιδιότητες, αυξημένη υδατική ικανότητα και παρουσία θρεπτικών συστατικών και μεγαλύτερη δυνατότητα απορρόφησης οργανικών υλικών από το έδαφος.

Τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων χρησιμοποιούνται, επίσης, και ως πηγή για τη μετατροπή τους σε βιοκαύσιμα. Η μεγάλη τους περιεκτικότητα σε οργανικά συστατικά, τα καθιστούν ιδανικά για μετατροπή σε θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια μέσω αναερόβιας χώνευσης ή θερμοδυναμικής επεξεργασίας, αναλόγως του ποσοστού της περιεχόμενης υγρασίας. Έτσι, παράγονται βιοκαύσιμα, όπως είναι το βιοαέριο, και αξιοποιούνται με σκοπό τη μείωση της χρήσης των ορυκτών καυσίμων. [9]

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα παραπροϊόντα και τα υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων, προτού οδηγηθούν στην απόρριψη τους ως «σκουπίδια» και παραμείνουν ανεκμετάλλευτα, μπορούν να αξιοποιηθούν για απομόνωση χρήσιμων συστατικών. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται πως οι απώλειες των τροφίμων, αποτελούν μια «δεξαμενή» από υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και θρεπτικά συστατικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικά σε προϊόντα τροφίμων, ύστερα από επεξεργασία που περιλαμβάνει χημικές, φυσικές, βιολογικές ή/και μηχανικές διεργασίες. Συνεπώς παραπροϊόντα όπως είναι οι φλούδες των φρούτων και των λαχανικών, οι σπόροι, τα υπολείμματα κρέατος, και τα κελύφη των αυγών, να μεν αποτελούν απόβλητα, όμως περιέχουν μια σειρά χρήσιμων συστατικών προστιθέμενης αξίας, όπως είναι τα βιοδραστικά συστατικά και το ενδιαφέρον για την ανάκτησή τους διαρκώς εντείνεται. [9], [10]

1.3 Ανάκτηση Συστατικών Προστιθέμενης Αξίας από Παραπροϊόντα

Τα παραπροϊόντα που προέρχονται από το στάδιο της αγροτικής παραγωγής είναι πλούσια σε φυτικές ίνες μερικές από τις οποίες περιέχουν σημαντικές ποσότητες χρωστικών, αντιοξειδωτικών ενώσεων και γενικώς ενώσεων με θετικές επιδράσεις στην υγεία. Οι φυτικές ίνες παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες και συνδέονται με τη μείωση πιθανότητας πρόκλησης στεφανιαίας νόσου και διάφορων τύπων καρκίνου. Οι φυτικές ίνες που προέρχονται από δημητριακά είναι κυρίως αδιάλυτες και συμβάλλουν στη διατροφή που προορίζεται για ρύθμιση εντερικών παθήσεων, ενώ οι φυτικές ίνες που προέρχονται από φρούτα και λαχανικά είναι διαλυτές και συντελούν στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον οι φυτικές ίνες παρουσιάζουν ενδιαφέρον και εξαιτίας των λειτουργικών τους ιδιοτήτων, όπως είναι η συγκρότηση του νερού, η ικανότητα διόγκωσης και σχηματισμού γέλης.

Άλλα θρεπτικά συστατικά που παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως προς τις προοπτικές αξιοποίησης, είναι τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες. Τα πρώτα χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσικές χρωστικές σε συστήματα τροφίμων, όμως παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και δράση εφάμιλλη με αυτή της βιταμίνης Α. Οι πολυφαινόλες κατέχουν επίσης αντιοξειδωτικό ρόλο και λειτουργούν ως εμπόδιο στην πρόκληση σοβαρών ασθενειών. Λειτουργούν επίσης και ως αντιμικροβιακές ενώσεις. Επιπλέον χρησιμοποιούνται και ως φυσικά συντηρητικά παρατείνοντας το χρόνο ζωής των τροφίμων.

Ο ρόλος των πρωτεϊνών με διατροφική αξία είναι καθοριστικός για τη διατροφή του ανθρώπου. Οι σύγχρονες διατροφικές τάσεις συστήνουν η λήψη των πρωτεϊνών που είναι χρήσιμες, να λαμβάνονται κυρίως από φυτικές πηγές, όπως είναι τα δημητριακά, τα όσπρια, οι ελαιούχοι σπόροι και η πράσινη βιομάζα και να περιορίζεται η λήψη τους από ζωικές πηγές. Η αναγκαιότητα κάλυψης των διατροφικών αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού, καθώς επίσης και η αναγκαιότητα αντικατάστασης των πηγών προέλευσης των πρωτεϊνών, εντείνουν το ενδιαφέρον της έρευνας για την εύρεση νέων πηγών πρωτεϊνών, αλλά και μηχανισμών απομόνωσής τους. Εκτός από την υψηλή προστιθέμενη αξία που προσδίδουν οι πρωτεΐνες σε ένα προϊόν διατροφής, είναι ιδιαίτερα χρήσιμες

και εξαιτίας των λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Ένα παραπροϊόν το οποίο προορίζεται ως πηγή άντλησης πρωτεϊνών, οφείλει να έχει και υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο αλλά και καλής ποιότητας πρωτεΐνες, γεγονός που καθορίζεται από την ύπαρξη ή μη των απαραίτητων αμινοξέων. Επιπλέον απαιτείται να μην παρουσιάζει αλλεργιογόνο δράση και να είναι απαλλαγμένο από τοξικές ουσίες. Έτσι έχουν προκύψει πρωτεϊνούχα προϊόντα υπό μορφή αλεύρων και συμπυκνωμάτων, τα οποία έχουν ενταχθεί σε ζωικά προϊόντα για επέκταση του πρωτεϊνικού τους φορτίου ή έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες εμπλουτισμού σε πρωτεϊνούχα ροφήματα. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες που προέρχονται από μη ζωικές πηγές, έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων όπως είναι τα υποκατάστατα τυριού. [11]

Τα παραπροϊόντα της ζυθοποιίας περιέχουν πληθώρα χρήσιμων συστατικών προστιθέμενης αξίας, όπως είναι οι πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, φαινολικά και σύνολο βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η περιεκτικότητα τους στα παραπάνω συστατικά, τα καθιστούν ως μια κατηγορία παραπροϊόντος που χρήζει μελέτης προκειμένου να αξιοποιηθούν για την απομόνωσή τους. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα εργασία και αναλύονται στα επόμενα κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ

2.1 Ιστορία Μπύρας

Η μπύρα είναι το ποτό που χαρακτηρίζεται από μακρά ιστορία και στενό δέσιμο με την ανθρώπινη κοινωνία. Πιθανότατα, δημιουργήθηκε τυχαία πριν από χιλιάδες χρόνια και ενώ έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνολογίες παραγωγής μπύρας η διαδικασία της παραδοσιακής της εκδοχής παραμένει απaráλλακτη.

Σύμφωνα με ορισμένες βιβλιογραφικές πηγές, η εμφάνιση της μπύρας συμπίπτει χρονολογικά με την εγκατάλειψη του νομαδισμού ως τρόπο ζωής. Η μπύρα, λοιπόν, φαίνεται να πρωτοεμφανίζεται περί το 9000 π.Χ., κατά τη Νεολιθική Επανάσταση και η δημιουργία της προέκυψε άθελα του σύγχρονου τότε ανθρώπου σε αποθήκες σιτηρών, που πρόσταζαν οι τότε ανάγκες. Άλλες πηγές αναφέρονται σε ποτά που προσομοιάζουν με μπύρα περί το 7000 π.Χ., ενώ σε άλλες πηγές η κατανάλωση μπύρας, χρονολογείται μόλις το 2800 π.Χ.

Η κατανάλωση της μπύρας τοποθετείται στη Μεσοποταμία, από την οποία «μεταναστεύει» ως συνήθεια στην Αίγυπτο το 3000 π.Χ. μέχρις ωσότου η τελευταία προσκολληθεί στη ρωμαϊκή επικράτεια και καθιερωθεί η κατανάλωση του οίνου. Ωστόσο το κρασί αποτέλεσε το ποτό που καταναλωνόταν στους κύκλους των ευγενών, ενώ η μπύρα παρέμενε βασική επιλογή του υπόλοιπου αιγυπτιακού πληθυσμού. Συνολικά, όμως, η μπύρα ήταν το αγαπημένο ποτό των Κελτών στις περιοχές της Γαλλίας, Γερμανίας, Ισπανίας, Πορτογαλίας, Βελγίου, Γερμανίας και Βρετανίας μέχρι και την επέκταση της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας. Επανήλθε, όμως, στο προσκήνιο ως κυρίαρχο ποτό κατά τον 5^ο μ.Χ. αιώνα οπότε και η Δυτική Ευρώπη, πέρασε στη γερμανική κυριαρχία.

Ως τον 12^ο μ.Χ. αιώνα, την εμπορική παραγωγή της μπύρας στην Ευρώπη, είχαν αναλάβει τα μοναστήρια. Στην πορεία οι μοναχοί παρήγαγαν περισσότερη μπύρα από όση μπορούσαν να καταναλώσουν ή να δωρίσουν σε προσκυνητές και επισκέπτες, για αυτό το λόγο και τους επιτράπηκε να την πωλούν σε μοναστηριακά μαγαζιά. Μετέπειτα, η παραγωγή της μπύρας σε βιομηχανικό πλέον επίπεδο, ανήλθε σε αστικά κέντρα χαρακτηριζόμενα ως μεγάλες αγορές. Μάλιστα, τα κέρδη των ζυθοποιών ήταν μεγάλα για αυτό και καθιερώθηκε η ζυθοποιία ως βιομηχανία και οι βασικές αρχές για την καθιέρωσή της ως βιομηχανία, τέθηκαν στο Λονδίνο το 1850. [12]

2.2 Πρώτες Ύλες για την Παραγωγή Μπύρας

2.2.1 Νερό

Το νερό αποτελεί το κύριο συστατικό του τελικού προϊόντος της μπύρας, για αυτό και ο ρόλος του στις διεργασίες παραγωγής είναι πολύ σημαντικός. Ως και στις μέρες μας, το νερό που χρησιμοποιείται στη ζυθοποιητική διαδικασία προέρχεται από πηγές του τόπου, στον οποίο τοποθετείται η ζυθοποιία, όπως συνέβαινε και στο παρελθόν. Οι πρώιμες ζυθοποιίες αντλούσαν το νερό που θα αξιοποιούσαν από πηγάδια ή από επιφανειακές πηγές, όπως είναι οι λίμνες και τα ποτάμια.

Η διαφορετική μορφή γεωλογίας επηρεάζει και την ποιότητα του νερού που προέρχεται από τα υπόγεια ύδατα. Συγκεκριμένα, τα διαλυμένα άλατα και ανόργανα συστατικά που περιέχει το νερό, από τόπο σε τόπο, καθόρισαν τα χαρακτηριστικά της κάθε ζυθοποιίας. Για παράδειγμα, η παρουσία

διττανθρακικών σε περιοχές όπως το Λονδίνο και το Δουβλίνο, οδηγούν σε αύξηση του pH του νερού που επηρεάζει τόσο την ικανότητα του πολτού όσο και τη δράση των ζυμών, για αυτό το σκοπό και προσθέτουν πολύ ψημένους κόκκους ώστε να φτάσει το pH σε πιο όξινες τιμές.

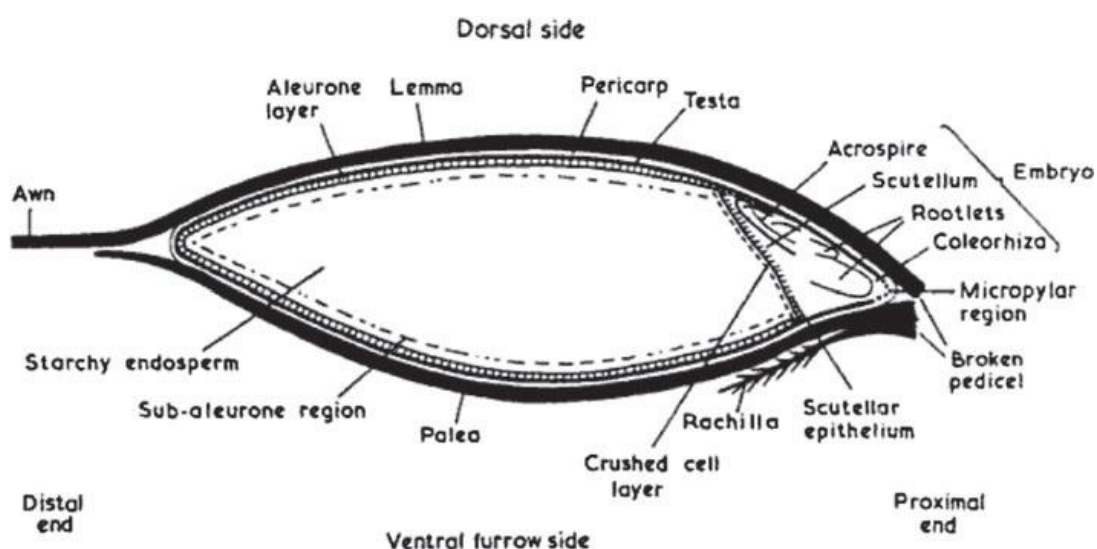
Ενώ οι παλιότερες ζυθοποιίες προσάρμοζαν την ποιότητα του προϊόντος τους στα χαρακτηριστικά του νερού που είχαν διαθέσιμο, οι σύγχρονες ζυθοποιίες χρησιμοποιούν νερό καθαρισμένο που έχει προκύψει είτε μέσω απόσταξης, είτε μέσω αντίστροφης ώσμωσης και έχει εμπλουτιστεί με καθορισμένες ποσότητες ιχνοστοιχείων και αλάτων. Συνεπώς, προκύπτει η ανάγκη για επεξεργασία του νερού, ώστε να γίνει κατάλληλο προς χρήση, ωστόσο απαιτείται εξαρχής να γίνει αποτίμηση των χαρακτηριστικών του νερού. Τέλος, οι παροχές του νερού που επεξεργάζονται με χημικά όπως χλώριο, φθόριο και άλλους απολυμαντικούς παράγοντες, θα πρέπει να ελέγχονται και εντός της ζυθοποιίας, προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη καρκινογόνων παραγόντων. [13]

2.2.2 Κριθάρι/Βύνη

Το κριθάρι αποτελεί το δεύτερο πιο σημαντικό συστατικό που συμβάλει στη ζυθοποιητική διαδικασία. Το κριθάρι ανήκει στο είδος των *Graminae* που περιλαμβάνει είδη όπως είναι το σιτάρι, το ρύζι, η σόγια, η σίκαλη, η βρώμη και άλλα, που αποδίδουν μεγάλες ποσότητες συγκομιδής και συμβάλλουν στην ανθρώπινη διατροφή. [14]

Ο σπόρος του κριθαριού είναι πολύ πλούσιος σε άμυλο, πρωτεΐνες και αποτελείται από τρία βασικά μέρη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2 παρακάτω:

- Το φύτρο ή αλλιώς το έμβρυο
- Το ενδοσπέρμιο, το οποίο διαχωρίζεται στον πρωτεϊνόκοκκο και το αμυλώδες ενδοσπέρμιο
- Το περίβλημα, το οποίο διαιρείται σε τρία επιμέρους τμήματα, το περικάλυμμα που είναι το πιο ενδόμυχο στρώμα που καλύπτει περιβάλλει τον πρωτεϊνόκοκκο, το περικάρπιο που είναι δομημένο σε στρώματα και τέλος τον φλοιό, ο οποίος καλύπτει το περικάρπιο. [15]



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής δομής του κόκκου κριθαριού [14]

Το εσωτερικό και το εξωτερικό τμήμα του κόκκου του κριθαριού διαχωρίζεται χάρη στα χαρακτηριστικά της διεπιφάνειας του περικαρπίου με το περικάλυμμα. Πιο συγκεκριμένα, το

περικάρπιο έχει κηρώδη υφή και λειτουργεί ως υδατοσταγές στρώμα και το περικάλυμμα διατηρεί το ρόλο μιας ημιπερατής μεμβράνης. [15] Οι σπόροι κριθαριού, που πρόκειται να βυνοποιηθούν, θα πρέπει να πληρούν ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως είναι το ανοιχτόχρωμο κίτρινο χρώμα, η παχύρρευστη υφή, η λεπτή φλούδα και το μεσαίο μέγεθος κόκκων. Η σκληρότητα των κόκκων του κριθαριού είναι ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό που καθορίζει την ικανότητα του να αποτελέσει ποικιλία προς βυνοποίηση. Οι ποικιλίες κριθαριού που διακρίνονται από πιο μαλακή δομή, είναι αυτές που σχηματίζουν βύνες, ενώ εκείνες που δε βυνοποιούνται είναι περισσότερο σκληρές. [16]

Η πληθώρα των γεύσεων μύρας που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, προκύπτουν από τις διαδικασίες επεξεργασίας της βύνης. Συγκεκριμένα, η γεύση εξαρτάται από την ξήρανση, το ψήσιμο της βύνης και από την ποικιλία κριθαριού, από την οποία έχει σχηματιστεί.

Οι μαύρες ή σοκολατένιες βύνες παρασκευάζονται από παχύ κριθάρι και περιέχουν άζωτο σε ποσοστό 1,5-1,6%. Προκύπτουν ύστερα από βλάστηση 4-6 ημερών και ξηραίνονται ως ποσοστό υγρασίας περίπου 5%. Ύστερα, πραγματοποιείται το ψήσιμό τους σε θερμοκρασίες περίπου 221-233°C για 2 έως 2,5 ώρες σε μεταλλικό κυλινδρικό θάλαμο. Κατά τη διάρκεια του ψησίματος, προκύπτουν αναθυμιάσεις, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια 15% του ξηρού βάρους τους και εμποδίζεται η απελευθέρωσή τους. Το ψημένο κριθάρι προκύπτει, κατά παρόμοιο τρόπο, με ψήσιμο σε περίπου ίδιες θερμοκρασίες, χωρίς όμως να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της βυνοποίησης. Είναι ένα συστατικό που χρησιμοποιείται φειδωλά και προσδίδει ένα άρωμα καφέ στη γεύση της μύρας, ενώ συμβάλλει και στην απόκτηση σκούρου χρώματος του τελικού προϊόντος. Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη θερμοκρασία ψησίματος ώστε αυτή να μην αυξηθεί πολύ, καθώς αυτό θα έχει αρνητικά αποτελέσματα τόσο στη δράση των ενζύμων, όσο και στο άμυλο των σπόρων. [13], [14]

Οι κρυστάλλινες βύνες ή βύνες καραμέλας χρησιμοποιούνται ευρύτατα χάρη στην πρόσδοση ευχάριστης γεύσης στο προϊόν. Περιέχουν άζωτο σε ποσοστό 1,4-1,5%, είναι πλούσιες σε σάκχαρα και διαβρέχονται μετά από ήπια ξήρανση. Το διαβρεγμένο προϊόν με ποσοστό υγρασίας περίπου 50% θερμαίνεται σε θερμοκρασία από 65,5 έως 76,5°C για 1,5-2 ώρες. Κατά αυτόν τον τρόπο, επέρχεται η υδρόλυση του αμύλου και το ενδοσπέρμιο, υγροποιείται και μετατρέπεται σε σιρόπι. Όταν αυτή η διεργασία ολοκληρωθεί, η θερμοκρασία φτάνει στους 150°C και η βύνη αερίζεται για περίπου μία ώρα. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την καραμέλωση των σακχάρων, προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο γεύσεις καραμέλας και καστανής ζάχαρης. Οι κρυστάλλινες βύνες, συνήθως, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βασικές βύνες στην παραγωγή μύρας. [13], [14]

2.2.3 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος (*Humulus lupulus*) είναι ένα αναρριχώμενο φυτό που ανήκει στο είδος των *Cannabaceae*. Ο λυκίσκος μοιάζει ως φυτό περισσότερο με το αμπέλι, όμως στην πραγματικότητα είναι καρπός και αυτό έχει να κάνει περισσότερο με τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσεται το φυτό. Ο λυκίσκος είναι δίοικο φυτό, δηλαδή απαρτίζεται τόσο από αρσενικά όσο και από θηλυκά άτομα. Στη ζυθοποιία είναι περισσότερο επιθυμητό, το λουλούδι που παράγει το θηλυκό φυτό. Όταν το αρσενικό μέρος επικονιάσει το θηλυκό, ξεκινούν να σχηματίζονται σπόροι και να μειώνεται η χρησιμότητα των φυτών.

Το θηλυκό τμήμα του φυτού περιέχει αδένες λουπουλίνης, που παράγουν τις πιο πικρές γεύσεις που προσδίδει το φυτό. Η ένταση της πικράδας, στην τελική γεύση της μύρας, εξαρτάται από την αναλογία των ενώσεων των α- και β-οξέων, που περιέχονται στο φυτό και από το χρονικό διάστημα

που βράζουν αυτές οι ενώσεις στο μούστο. Η πρόσδοση πικράδας και άλλων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στο προϊόν της μπίρας είναι ο λόγος που χρησιμοποιείται από τους ζυθοποιούς.

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων του λυκίσκου, όπως είναι το μυρκένιο, το χουμουλένιο και το καρυφυλλένιο, βράζουν αρκετά γρήγορα, έτσι όταν ο ζυθοποιός επιθυμεί την παρουσία τους στην μπίρα, προσθέτει το λυκίσκο στα τελευταία 5-10 λεπτά του βρασμού, προκειμένου επίσης να διατηρηθούν αναλλοίωτα. Αυτοί οι τύποι λυκίσκου χαρακτηρίζονται ως «άρωμα» λυκίσκου. Στα αιθέρια έλαια του λυκίσκου περιέχονται και άλλες ενώσεις οι οποίες είναι λιγότερο πτητικές και είναι διαλυτές στο μούστο (ζυθογλεύκος). Για να εξασφαλιστεί η παρουσία τους στην μπίρα ο λυκίσκος, σε αυτήν την περίπτωση, προστίθεται περίπου 20 λεπτά πριν την ολοκλήρωση του βρασμού. Ο λυκίσκος, που λαμβάνει μέρος σε αυτό το στάδιο της διεργασίας, ονομάζεται «γεύση» λυκίσκου. Η προσθήκη του λυκίσκου, στην έναρξη του βρασμού, δεν έχει ως στόχο την ενίσχυση των αρωμάτων και των γεύσεων, μιας και όπως ειπώθηκε παραπάνω, τα συστατικά αυτά θα έχουν εξατμιστεί. Αποσκοπεί, όμως, στην ενίσχυση της πικράδας στην τελική γεύση. [13]

2.2.4 Μαγιά

Η μαγιά-ζύμη είναι ένας μονοκύτταρος οργανισμός και πρακτικά είναι μύκητας. Όπως κάθε μονοκύτταρος οργανισμός, περιέχει έναν πυρήνα και άλλα οργανίδια που περικλείονται μέσα σε μία μεμβράνη. Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία, χωρίζονται στις ζύμες αφρού και τις ζύμες πυθμένα. Συχνά χρησιμοποιούμενη ζύμη αφρού είναι ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Η μαγιά αυτή χρησιμοποιείται για την παρασκευή μπίρας τύπου Ale (αφροζύμωτη), όπου ανέρχεται στην επιφάνεια, σχηματίζοντας ένα στρώμα ζύμης. Τυπική ζύμη βυθού είναι ο μύκητας *Saccharomyces pastorianus*, ο οποίος χρησιμοποιείται για τη ζύμωση μπίρας τύπου lager (βυθοζύμωτη), και στο τέλος κατακρημνίζεται. Ο δεύτερος, επιπλέον, είναι ικανός να υδρολύσει τη μελιβιόζη σε περισσότερους ζυμώσιμους μονοσακχαρίτες, σε αντίθεση με το *S. cerevisiae*, γεγονός που οδηγεί σε μία πιο «τραγανή» γεύση στην μπίρα. Επιπλέον, η μαγιά τύπου lager, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε υψηλότερες θερμοκρασίες, προσδίδοντας μια χαρακτηριστική γεύση καπνίσματος. Γενικώς, η χρήση της μαγιάς, έχει άμεσο αντίκτυπο και στην τελική γεύση της μπίρας, για αυτό το λόγο και η επιλογή και η χρήση των μυκήτων, είναι μια μεταβλητή που χειρίζεται ο ζυθοποιός. Πολλές φορές ο μεταβολισμός της μαγιάς προς παραγωγή σακχάρων οδηγεί στο σχηματισμό κάποιων παραπροϊόντων, τα οποία προσδίδουν μία επίγευση πράσινου μήλου, βουτύρου ή μαγειρεμένου καλαμποκιού. Αυτά τα συστατικά, εν τέλει, θα απορριφθούν μέσω ενός βήματος χρονοβόρου και αρκετά σημαντικού. Από την άλλη μεριά, κάποια παραπροϊόντα είναι επιθυμητά για ορισμένα είδη μπίρας και προσδίδουν επίγευση γαρύφαλλου, μπανάνας ή φρούτων. Οι ζύμες τύπου Ale συμβάλλουν στο σχηματισμό εστέρων, ενώσεων, που προσδίδουν και στα φρούτα τα χαρακτηριστικά τους αρώματα. [13]

2.3 Διεργασίες Παραγωγής Μπίρας

2.3.1 Συγκομιδή Κριθαριού

Στο παρελθόν, συνηθιζόταν τα ώριμα φυτά κριθαριού να κόβονται και να δένονται σε στάχια. Τα στάχια διατάσσονταν σε στοίβες και παρέμεναν στο χωράφι, ώσπου να στεγνώσουν. Αλωνίζονταν σε μεταγενέστερο χρόνο, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μικροβιολογικές αλλοιώσεις. Τώρα πια, όμως, η συγκομιδή και το αλώνισμα, πραγματοποιούνται ταυτόχρονα. Τα ώριμα φυτά κόβονται, οι κόκκοι αλωνίζονται, διαχωρίζονται και συκρατούνται και τα άχυρα απορρίπτονται. Κατά τη

συγκομιδή, μεγάλες ποσότητες φρέσκων κόκκων μεταφέρονται από το χωράφι και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα υποβάλλονται σε επεξεργασία και αποθήκευση, προκειμένου να εξασφαλίζεται η διατήρηση της ποιότητάς τους. Ύστερα από τη συγκομιδή, επέρχεται η ξήρανση των σπόρων, η οποία όμως οφείλει να είναι ελεγχόμενη προκειμένου να μην αλλοιώνονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Τέλος, η αποθήκευση τους, είναι επίσης σημαντική και δε θα πρέπει να είναι ανάλογη με την αποθήκευση των σιτηρών που προορίζονται για ζωοτροφές, μιας και αυτές οι τεχνικές, είναι ακατάλληλες για βύνες. [14]

2.3.2 Προεπεξεργασία

Οι σπόροι κριθαριού, στους οποίους δεν έχει αφαιρεθεί η υγρασία, αναπνέουν γρηγορότερα από εκείνους που έχουν στεγνώσει. Για περιεχόμενη υγρασία από 13% και πάνω, ο ρυθμός αναπνοής είναι αυξημένος. Επιπλέον, με περιεχόμενη υγρασία περίπου στο 13-15%, το κριθάρι μπορεί να αποθηκευτεί, αρκεί να ελέγχεται η πιθανότητα παρουσίας παράσιτων. Η μείωση όμως της περιεχόμενης υγρασίας σε ποσοστό 10-12% και η διατήρηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στους 12°C, οδηγεί στην αποθήκευση της πρώτης ύλης για περίπου ένα χρόνο χωρίς να είναι αναγκαίος ο εξαερισμός ή ψύξη. Κατά αυτόν τον τρόπο μειώνεται και το κόστος της αποθήκευσης.

Όταν το κριθάρι μετατρέπεται σε βύνη, υφίσταται μια διαδικασία προκαθαρισμού προκειμένου να απομακρυνθούν ακαθαρσίες και περνά στο στάδιο της μείωσης της υγρασίας για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα ένας σχολαστικός καθαρισμός με σκοπό την απομάκρυνση κατεστραμμένων κόκκων ή και ακαθαρσιών που δεν απομακρύνθηκαν στο προηγούμενο στάδιο. Ύστερα από αυτό το στάδιο, οι σπόροι του κριθαριού ταξινομούνται με βάση το μέγεθός τους.

Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο του προκαθαρισμού, λαμβάνει χώρα η διεργασία του κοσκινίσματος συνδυασμένη με αναρρόφηση του ρεύματος των κόκκων με αέρα. Οι κόκκοι διέρχονται από μεγάλα κόσκινα τα οποία συγκρατούν τις μεγάλες μεγέθους ακαθαρσίες, όπως είναι σβώλοι χώματος, πέτρες, άχυρα κ.α. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα ένα ακόμη στάδιο για την απομάκρυνση πιο μικρών τμημάτων που θεωρούνται προσμίξεις μικρότερου μεγέθους, όπως είναι η άμμος ή σπόροι από δέντρα. Τα διαφορετικού μεγέθους κλάσματα, που προκύπτουν, συλλέγονται ξεχωριστά. Ο αέρας, που ανακυκλοφορεί, μεταφέρει σκόνη και ελαφριά τμήματα τα οποία απομακρύνονται σε θαλάμους καθίζησης ή κυκλώνες. Τέλος, στο στάδιο του προκαθαρισμού, συμμετέχουν και μαγνητικοί διαχωριστήρες, προκειμένου να αφαιρεθούν τυχόν αντικείμενα ή θραύσματα από σίδηρο ή χάλυβα.

Οι κόκκοι του κριθαριού διαχωρίζονται κατά σειρά μεγέθους, μιας και μέσα στον όγκο των κόκκων το περιεχόμενο άζωτο, ο ρυθμός απορρόφησης νερού, ο ρυθμός της βλάστησης και τα χαρακτηριστικά της βύνης διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος των κόκκων. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες βυνοποίησης διαφέρουν για κάθε βαθμίδα μεγέθους. Παρ' όλα αυτά, ο διαχωρισμός και η ξεχωριστή επεξεργασία κάθε βαθμίδας είναι αρκετά δαπανηρά, έτσι λοιπόν, μαζί με τις πιο μικρόκοκκες ακαθαρσίες απορρίπτονται και κόκκοι κριθαριού, μεγέθους 2,2-2,3 mm. Συνολικά, απορρίπτονται περίπου το 20% του συνόλου του κριθαριού, το οποίο οδηγείται κυρίως ως ζωοτροφή. [14]

Η βαθμονόμηση των κόκκων του κριθαριού πραγματοποιείται μέσω μιας χοάνης και οι σπόροι υφίστανται δονήσεις. Η χοάνη αποτελείται από οπές τριών διαμέτρων. Η πρώτη διάμετρος έχει μήκος 2,78 mm, η δεύτερη 2,38 mm και η τελευταία είναι ίση με 1,98 mm. Οι σπόροι που δεν περνούν από

τις πρώτες οπές, θεωρούνται παχιοί. Οι σπόροι, που διέρχονται από τις δεύτερες οπές, χαρακτηρίζονται λεπτοί. [17]

2.3.3 Βυνοποίηση

Η διεργασία της βυνοποίησης περιλαμβάνει τρία στάδια. Τη διαβροχή, την εκβλάστηση και την ξήρανση. Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο της διαβροχής, οι σπόροι του κριθαριού, βυθίζονται σε νερό το οποίο είναι υψηλής ποιότητας. Όταν το κριθάρι εμβαπτίζεται σε νερό, μέρος του νερού εισέρχεται στο εσωτερικό του σπόρου και ενυδατώνει το έμβρυο και την αλευρόνη. Κατά αυτόν τον τρόπο, ενεργοποιούνται οι βιολογικοί μηχανισμοί στο εσωτερικό του καρπού. Επιπλέον, και ο φλοιός απορροφά νερό.

Οι σπόροι ενυδατώνονται από το έμβρυο ως τον σκελετό. Η κίνηση του νερού, που διαβρέχει το ενδοσπέρμιο, είναι αργή και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ενυδατώνεται αποτελεσματικά ολόκληρος ο σπόρος. Μέσω της διαβροχής επιτυγχάνεται ποσοστό υγρασίας περίπου 45%, το οποίο είναι ικανοποιητικό, γιατί ευνοεί την εκβλάστηση χωρίς η τελευταία να γίνεται σε υπερβολικό βαθμό. Για να φτάσει η περιεχόμενη υγρασία σε αυτό το ποσοστό, απαιτούνται περίπου 30-50 ώρες και θερμοκρασίες 5-18°C. Το νερό διαβροχής αλλάζει κάθε 6-8 ώρες. [15], [17]

Ύστερα από το στάδιο της διαβροχής, επέρχεται το στάδιο της εκβλάστησης, κατά το οποίο οι σπόροι μεταφέρονται σε δοχεία που έρχονται σε επαφή με ρεύμα υγρού αέρα που ρέει μέσω του στρώματος των σπόρων και διατηρεί τη θερμοκρασία ανάμεσα στους 15 με 18°C. Η διεργασία της εκβλάστησης διαρκεί περίπου 6-7 ημέρες. [15] Μόλις ξεκινά η εκβλάστηση, ξεκινά και η παραγωγή μιας ορμόνης, του γεββεριλικού οξέος, η οποία διαχέεται στο στρώμα της αλευρόνης και σηματοδοτεί την παραγωγή ενζύμων που ενισχύουν την ανάπτυξη των σπόρων. Τα ένζυμα που αναπτύσσονται, περιλαμβάνουν εκείνα που παράγονται ήδη από τους σπόρους, δηλαδή τα ζυμογόνα ένζυμα, τα οποία όμως χρειάζονται την παρουσία του νερού ώστε να ενεργοποιηθούν. Παράλληλα, όμως, ενθαρρύνεται και η παραγωγή άλλων ενζύμων στο στρώμα της αλευρόνης, τα οποία είναι τα ακόλουθα:

- α- και β- αμυλάσες που μετατρέπουν το άμυλο σε χρήσιμα σάκχαρα
- δεξτρίνη 6-άλφα-γλυκανοϋδρολάση, το οποίο διασπά το άμυλο σε μικρότερα μέρη
- γλυκανάσες και πεντοζανάσες που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα στο ενδοσπέρμιο
- πρωτεάσες που διασπούν τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος και του ενδοσπερμίου
- φυτάσες, οι οποίες απελευθερώνουν φωσφορικό οξύ και μειώνουν το pH

Ο βαθμός στον οποίο τροποποιείται το ενδοσπέρμιο, μέσω της δράσης του νερού, είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Αν τροποποιηθεί μόνο ένα μέρος του ενδοσπερμίου, πραγματοποιείται η παραγωγή μιας μερικώς τροποποιημένης βύνης. Σε αυτήν την περίπτωση, δημιουργείται μια σκληρή εσοχή στην οποία δεν έχουν δράσει τα ένζυμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι μερικώς τροποποιημένες βύνες να πρέπει να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία στο στάδιο της πολτοποίησης, προκειμένου να μετατραπεί σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Επιπλέον, παρουσιάζεται μεγαλύτερη ποσότητα γλουκάνης στον πολτό, γεγονός το οποίο αντικατοπτρίζεται στο τελικό προϊόν της μύρας, με τη μορφή της θολότητας. Παράλληλα, σημαντικός παράγοντας για τη διεργασία της βυνοποίησης είναι και η επαρκής διάσπαση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, το γεγονός ότι η διάσπαση των πρωτεϊνών οδηγεί στην απελευθέρωση ελεύθερων αμινοξέων, αφενός συμβάλλει θετικά στο στάδιο της ζύμωσης, μιας και αποτελούν θρεπτικό συστατικό για τις ζύμες, αφετέρου, όμως, ενδεχομένως να

οδηγήσουν και στην ενίσχυση των αντιδράσεων Maillard γεγονός το οποίο δυνητικά μπορεί να καταλήξει σε πιο σκουρόχρωμο προϊόν ή σε έντονες υφές καραμέλας, περισσότερο από το επιθυμητό. Από την άλλη μεριά, η ανεπαρκής αποικοδόμηση των πρωτεϊνών οδηγεί σε αρνητικά αποτελέσματα στη μετατροπή του αμύλου σε ζυμώσιμα σάκχαρα και στην έντονη παρουσία αφρού και θολότητας στο τελικό προϊόν. [17]

Προκειμένου να σταματήσει η εκβλάστηση, στην πραγματικότητα δηλαδή η δράση των ενζύμων, η παραγόμενη βύνη ξηραίνεται στους 40-60°C μέχρι τελικής υγρασίας περίπου 4-5%, προκειμένου να αποφευχθεί μικροβιακή αλλοίωση και να ολοκληρωθούν οι διεργασίες της εκβλάστησης. Η ξηρή, πλέον, βύνη αποθηκεύεται για 3-4 εβδομάδες, προκειμένου να ομογενοποιηθεί και να επέλθει ισορροπία. [15]

2.3.4 Ζυθοποίηση

2.3.4.1 Άλεση

Η διεργασία της ζυθοποίησης ξεκινά με την άλεση της βύνης κριθαριού που προέκυψε από το στάδιο της βυνοποίησης. Με την άλεση, επιτυγχάνεται η αύξηση της επιφάνειας επαφής με το νερό που θα ακολουθήσει σε μεταγενέστερο στάδιο. Η βύνη αλέθεται με προσοχή προκειμένου να παραμείνει αναλλοίωτος ο φλοιός της και το υπόλοιπο σώμα αλέθεται σε σκόνη. Η σκόνη που προκύπτει είναι πλούσια σε άμυλο και περιέχει πληθώρα ενζύμων που θα το αποικοδομήσουν όταν προστεθεί νερό σε επόμενο στάδιο. [14] Η βύνη αλέθεται σε μύλους. Ο συνηθέστερος τύπος μύλου, είναι ο μύλος που περιλαμβάνει χαλύβδινους κυλίνδρους, μεταξύ των οποίων συνθλίβεται η βύνη. Ένας άλλος τύπος μύλου είναι εκείνος που απαρτίζεται από έναν ρότορα στον οποίο είναι προσαρτημένες μεταλλικές ράβδοι που ονομάζονται σφυριά. Ο ρότορας περιστρέφεται πολύ γρήγορα και έτσι τα σφυριά κόβουν τους κόκκους της βύνης. [18]

2.3.4.2 Πολτοποίηση

Στο στάδιο της πολτοποίησης, οι βυνοποιημένοι σπόροι, που έχουν αλεστεί από το προηγούμενο στάδιο, έρχονται σε επαφή με καυτό νερό. Δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα τόσο στην ποσότητα όσο και στη θερμοκρασία του νερού που προστίθεται, μιας και η τελική θερμοκρασία του πολτού που θα προκύψει θα πρέπει να είναι κοντά στους 65°C και η τελική του σύσταση να είναι λεπτή και πορώδης. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για περίπου 30 λεπτά. Κατά την πολτοποίηση, λαμβάνει χώρα τόσο η αμυλόλυση, δηλαδή η αποικοδόμηση του αμύλου από τα αντίστοιχα ένζυμα όσο και σε μικρότερο βαθμό διάσπαση νιτρικών ενώσεων, η λεγόμενη πρωτεόλυση. [14]

2.3.4.3 Βρασμός

Ο μούστος ή αλλιώς το ζυθογλεύκος, που προκύπτει από το στάδιο της πολτοποίησης, βράζει σε χάλκινο βραστήρα, προκειμένου να ενισχυθεί η δράση των ενζύμων, να καταβυθιστούν ορισμένα πρωτεϊνικά υλικά, να αποστειρωθεί το υλικό και να επέλθουν επιθυμητές φυσικοχημικές αλλαγές. Ο βρασμός, πολύ συχνά, συνοδεύεται από την προσθήκη σακχάρων και σιροπιών, υλικών που ευνοούν την πήξη των πρωτεϊνούχων συστατικών και λυκίσκου ή προϊόντων που προέρχονται από λυκίσκο. Η προσθήκη του λυκίσκου επιδρά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Οι ουσίες που εκχυλίζονται και προσδίδουν πικρή γεύση, είναι τα α-οξέα και τα β-οξέα. Τα α-οξέα κατά το βρασμό ισομερίζονται, σε ισομερή που είναι πιο διαλυτά στο νερό, ενώ τα β-οξέα οξειδώνονται. Έτσι, προκύπτει πως ο βρασμός θα πρέπει να γίνεται μέσα σε ένα βέλτιστο χρόνο που είναι τα 90 λεπτά ως προς την πρόσδοση πικρής γεύσης. [14]

Η διαδικασία του βρασμού έχει ρυθμιστεί με σκοπό όλα τα συστατικά του ζυθογλεύκου, που βράζει, να έρθουν σε επαφή με τον ατμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση συστατικών και ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν θείο μιας και προσδίδουν άσχημες γεύσεις στην μύρα. Οι πιο πτητικές ενώσεις απομακρύνονται από την μύρα μέσω του ατμού. Όσο πιο πολύ έρχεται σε επαφή η βύνη που βράζει με τον ατμό, τόσο πιο αποτελεσματικά απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα συστατικά, όπως είναι το διμεθυλοσουλφίδιο. [19]

Επιπλέον, μέσω του βρασμού, ενισχύονται και οι αντιδράσεις Maillard, οι οποίες συμβάλλουν στον καθορισμό του χρώματος της μύρας παράγοντας, συγκεκριμένα μακρομόρια που οδηγούν σε πιο σκουρόχρωμα αποτελέσματα και παράλληλα συμμετέχουν στην πρόσδοση μιας γεύσης που θυμίζει καραμέλα. Τέλος, ο βρασμός επιδρά και στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών μιας και το pH του νερού στο οποίο βράζει το ζυθογλεύκος αποκτά τιμές κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Έτσι, το νερό αντιδρά με τους πεπτιδικούς δεσμούς και σχηματίζονται αμινοξέα, που είναι χρήσιμα για τη δράση των ζυμών. [20]

2.3.5 Ζύμωση

Όπως ειπώθηκε και πρωτύτερα, η ζύμωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της μαγιάς, που κατατάσσεται στις ζύμες αφρού και τις ζύμες βυθού, με συχνά χρησιμοποιούμενους μύκητες, τους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces pastorianus*, αντίστοιχα. Η ζύμωση πραγματοποιείται με την ανάμειξη του μούστου (ζυθογλεύκου) με τη μαγιά σε θερμοκρασία περίπου 16°C για τις ζύμες αφρού και στους 10°C για τις ζύμες βυθού. Για κάθε λίτρο ζυθογλεύκου, χρησιμοποιούνται 1-2 γραμμάρια πεπιοσμένης μαγιάς. Η μαγιά αναπτύσσεται αντλώντας άζωτο από τα αμινοξέα του ζυθογλεύκου και αντλώντας άνθρακα και ενέργεια από τη γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη μαλτόζη και μαλτοτριόζη που περιέχεται σε αυτό. Οι ζύμες πολλαπλασιάζονται κατά 5-10 φορές το βάρος τους και η ικανότητα μεταβολισμού τους αυξάνεται ραγδαία και έτσι αποκτούν την ικανότητα μετατροπής των υδατανθράκων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η ζύμωση λαμβάνει χώρα από διάστημα 2 έως 10 ημερών.

Η γεύση της μύρας που παράγεται εξαρτάται ως ένα βαθμό και από την ποιότητα του ζυθογλεύκου που προκύπτει, αλλά και από τις μεταβολικές ιδιότητες της μαγιάς που χρησιμοποιείται. Οι πιο σημαντικές αντιδράσεις που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας είναι οι αντιδράσεις που παράγουν αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, δικετόνες, εστέρες, μερκαπτάνες καιθειώδεις ενώσεις.

Η μαγιά, με το πέρας της ζύμωσης, θα πρέπει να διαχωριστεί από την μύρα μέσω φυγοκέντρισης. Ένα μέρος της ζύμης χρησιμοποιείται για εμβολιασμό επόμενων ζυθογλεύκων. Ο διαχωρισμός, όμως, της μαγιάς, θα πρέπει να συμβεί σε ένα χρόνο που θα έχει ολοκληρωθεί σε σημαντικό βαθμό η μετατροπή των υδατανθράκων σε αλκοόλη. Έτσι, επιλέγονται ζύμες με τα ακόλουθα κριτήρια:

- Ικανοποιητικός ρυθμός και έκταση της ανάπτυξης της ζύμης χωρίς να είναι ιδιαίτερα μεγάλος ούτε και ιδιαίτερα μικρός
- Υψηλός ρυθμός και έκταση της ζύμωσης, ώστε να επιτυγχάνεται γρήγορη μετατροπή των υδατανθράκων σε αιθανόλη
- Αναγκαιότητα παραγωγής μύρας τύπου ale ή lager [14]

2.3.6 Μεταζυμωτικές Ενέργειες

Εφόσον ολοκληρωθεί και ο διαχωρισμός της μαγιάς από την μύρα, ακολουθούν ορισμένες ενέργειες για την παρασκευή του τελικού προϊόντος. Αυτές είναι το φιλτράρισμα, η εμφιάλωση και η αποθήκευση. Πιο συγκεκριμένα, το φιλτράρισμα, πραγματοποιείται μόλις περάσει ο χρόνος ξεκούρασης στις δεξαμενές. Το φιλτράρισμα ονομάζεται αλλιώς και διαύγαση. Είναι πολύ σημαντικό στάδιο και χρειάζεται προσοχή, γιατί από τη μια, οδηγεί στη σταθεροποίηση και τη λαμπερή εικόνα της μύρας και από την άλλη θα πρέπει να έχει την σωστή ισορροπία, ώστε να διατηρούνται αναλλοίωτα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας που την κάνουν ξεχωριστή. Υπάρχουν, λοιπόν, πολλά είδη φίλτρων, όπως και τρόποι φιλτραρίσματος με τα πιο συνηθισμένα να είναι αυτά που γίνονται με γη διατόμου ή με εκείνα που χρησιμοποιούν κάποιες πλάκες με συγκεκριμένους πόρους που απομακρύνουν τα ανεπιθύμητα σωματίδια.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η εμφιάλωση και κατ' επέκταση η αναγκαιότητα αποθήκευσης της μύρας. Οι σύγχρονες ζυθοποιίες, διαθέτουν αυτόματες μηχανές εμφιάλωσης που ξεπλένουν και ύστερα γεμίζουν τα μπουκάλια και προσθέτουν ετικέτες και πώματα. Σε μικροζυθοποιίες αυτό γίνεται τις περισσότερες φορές χειρωνακτικά και αν όχι ολόκληρη η διαδικασία σίγουρα κάποια στάδια. Πριν την εμφιάλωση, συνήθως, γίνεται παστερίωση (θέρμανση για την θανάτωση των διάφορων μικροοργανισμών) ο βαθμός της οποίας προσδιορίζεται ανάλογα με τον τρόπο αποθήκευσης τις μύρας και το χρονικό επιτρεπόμενο διάστημα κατανάλωσης της. Μην ξεχνάμε ότι οι μύρες εμφιαλώνονται είτε σε βαρέλια, είτε σε μπουκάλια διαφορετικών λίτρων, είτε τέλος σε κουτάκια. Στα κουτάκια που κατά κύριο λόγο η παραμονή είναι μεγαλύτερη γίνεται και πιο έντονη παστερίωση. Ως προς την αποθήκευση, η μύρα, με δεδομένο ότι περιέχει μικρή ποσότητα αλκοόλ, είναι ένα προϊόν ευαίσθητο που χρήζει προσοχής και να φυλάσσεται σε δροσερό περιβάλλον μακριά από την έκθεση στον ήλιο και υψηλές θερμοκρασίες. [21]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΖΥΘΟΠΟΙΙΑΣ

3.1 Εξαντλημένοι Σπόροι Κριθαριού(Brewers' Spent Grain)

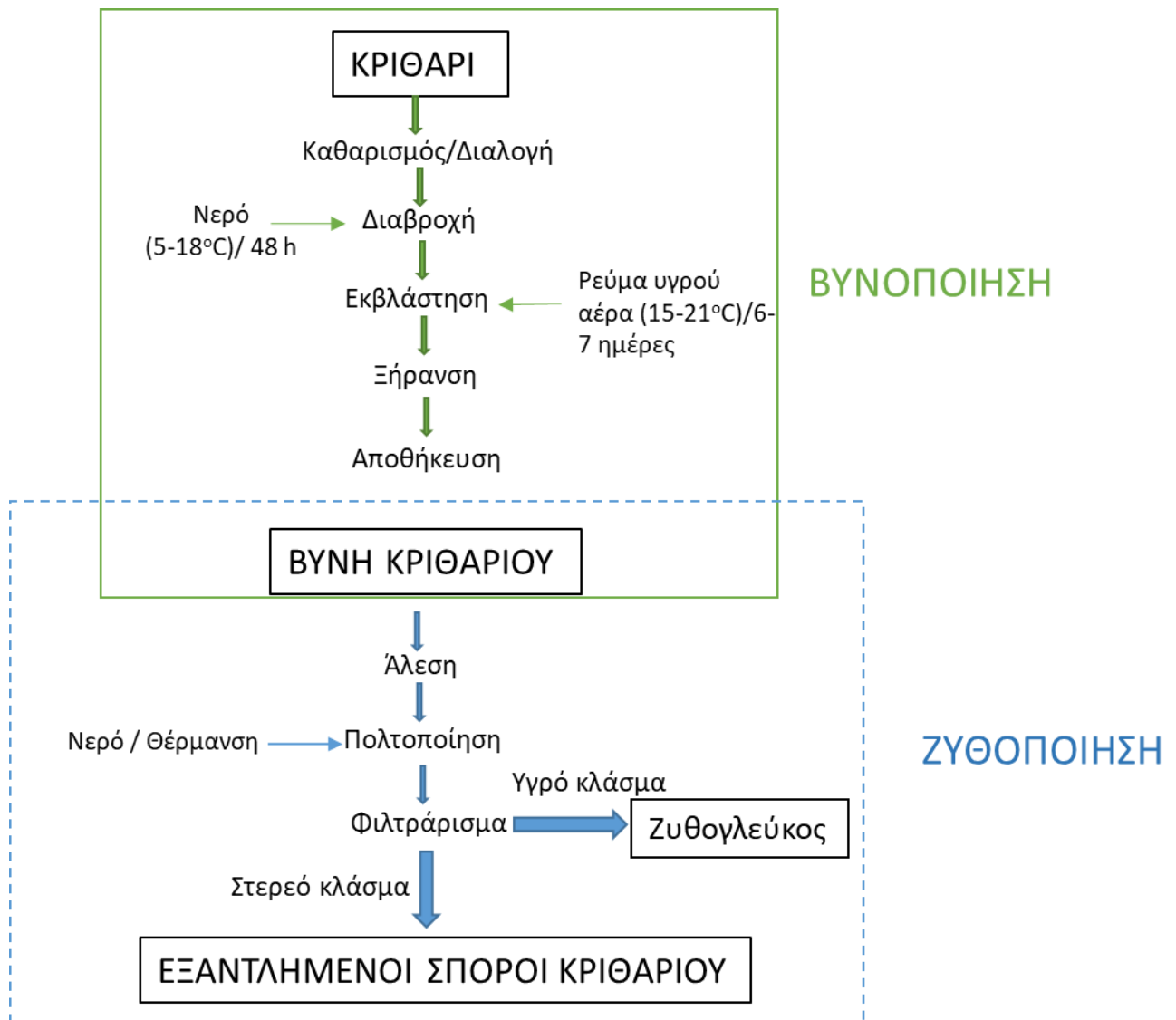
Κατά τη διαδικασία της παραγωγής μύρας, παράγονται παραπροϊόντα, με τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού (Brewer's Spent Grain, BSG), να αποτελούν εκείνο το οποίο βρίσκεται σε αφθονία, αποτελώντας το 85% αυτών. Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού απομακρύνονται ως στερεό παραπροϊόν, ύστερα από την παραγωγική διαδικασία, και υπολογίζεται πως σε ετήσια βάση παράγονται περίπου 39 εκατομμύρια τόνοι παγκοσμίως, εκ των οποίων, οι 3,4 εκατομμύρια τόνοι παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Εκτιμάται, πως για κάθε 100 λίτρα παραγόμενης μύρας, απομακρύνονται 20 κιλά BSG τα οποία πωλούνται προς 35 € ανά τόνο για την αξιοποίησή τους ως ζωοτροφές. Ωστόσο, το ενδιαφέρον των ερευνών έχει επικεντρωθεί στη χρήση τους για την απομόνωση χρήσιμων βιοδραστικών συστατικών για τον εμπλουτισμό τροφίμων, χάρη στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες και πρωτεΐνες και την αυξημένη τους διαθεσιμότητα, συνδυασμένη με τη χαμηλή τους τιμή. Η εύρεση εναλλακτικών τρόπων χρήσης των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού προσδίδει όφελος τόσο στη ζυθοποιία, η οποία θα μπορεί να αξιοποιήσει το παραπροϊόν της, όσο και σε περιβαλλοντικό επίπεδο μιας και η επαναχρησιμοποίηση αποβλήτων της βιομηχανίας είναι μια σημαντική ενέργεια μείωσης του όγκου της. [22]

3.1.1 Παραγωγή

Στο στάδιο της προετοιμασίας για τη διαδικασία της ζυθοποίησης, οι σπόροι κριθαριού, καθαρίζονται και ταξινομούνται με βάση το μέγεθός τους. Ύστερα από το πέρας 4-6 εβδομάδων «ανάπαυσης», πραγματοποιείται η βυνοποίηση, μια διαδικασία ελεγχόμενης βλάστησης, που ως στόχο έχει την αύξηση του ενζυμικού περιεχομένου των κόκκων.

Κατά το στάδιο της βυνοποίησης, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, λαμβάνουν χώρα τρεις διεργασίες, η διαβροχή, η εκβλάστηση και η ξήρανση. Στο στάδιο της διαβροχής προκαλείται η αύξηση του ποσοστού της περιεχόμενης υγρασίας στο 42-48%, διαμορφώνοντας ένα περιβάλλον κατάλληλο για τη δράση των ενζύμων στο επόμενο στάδιο. Στη συνέχεια, ακολουθεί η εκβλάστηση, κατά την οποία ξεκινά η ενζυμική δραστηριότητα στο στρώμα της αλευρόνης. Τα ένζυμα, που αναπτύσσονται σε αυτό το στάδιο, καταλύουν αντιδράσεις αμυλόλυσης και πρωτεόλυσης και συμβάλλουν στην τροποποίηση του ενδοσπερμίου, με σκοπό τη μετατροπή του κριθαριού σε βύνη. Με την πάροδο 6-7 ημερών, ολοκληρώνεται η τροποποίηση του ενδοσπερμίου και επέρχεται η ξήρανση των σπόρων του κριθαριού, ώστε να μειωθεί η περιεχόμενη υγρασία τους, προκειμένου να αποφευχθεί η μικροβιακή αλλοίωση και η πλέον ξηρή βύνη, αποθηκεύεται για 3-4 εβδομάδες.

Στη συνέχεια, η βύνη αλέθεται και αναμειγνύεται με νερό και υφίσταται ήπια θέρμανση που έχει ως απώτερο σκοπό την ενίσχυση της ενζυμικής υδρόλυσης συστατικών της, όπως είναι το άμυλο, οι πρωτεΐνες, οι β-γλυκάνες και οι αραβινοξυλάνες και της διαλυτοποίησης των προϊόντων διάσπασής της. [15] Κατά τη διαδικασία αυτή, το άμυλο διασπάται και προκύπτουν ζυμώσιμοι υδατάνθρακες. Η βύνη, που προκύπτει, ζυμώνεται με τη βοήθεια ζυμών και έτσι προκύπτει η μύρα. Τα στερεά υπολείμματα που δε διαλύονται, συγκροτούν τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού. [22] Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής των διεργασιών που οδηγούν στη δημιουργία των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού.



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής δημιουργίας BSG [15]

Στις παραδοσιακές ζυθοποιίες, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο, καθώς συγκροτούν το στρώμα από το οποίο διέρχεται ο πολτός για να διαχωριστεί ο μούστος (ζυθογλεύκος). Για αυτό το λόγο και η κοκκομετρία της άλεσης της βύνης είναι καθοριστική, ώστε τα στρώματα των BSG να παραμένουν άθικτα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα από μικρές ζυθοποιίες, αλλά και στις βιομηχανίες μεγαλύτερου βεληνεκούς, όπου χρησιμοποιούν ένα εξειδικευμένο φίλτρο το οποίο χρήζει αποτελεσματικότερης άλεσης της βύνης και δε βασίζεται στη χρήση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού ως στρώμα. [22]

3.1.2 Χημική Σύσταση

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού BSG αποτελούνται από το περικάρπιο και το φλοιό που καλύπτουν τους αρχικούς κόκκους κριθαριού. Η χημική σύσταση των BSG εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία του δημητριακού που χρησιμοποιείται, ο χρόνος στον οποίο πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή του, οι συνθήκες της βυνοποίησης και της ζυθοποίησης και η ύπαρξη ή μη των διάφορων πρόσθετων. [22] Παρακάτω, στον Πίνακα 1 παρατίθεται συγκεντρωμένη

η σύσταση των BSG, όπως έχει προκύψει από διάφορες βιβλιογραφικές πηγές. ([23], [24], [25], [26],[27])

Πίνακας 1. Χημική Σύσταση των Εξαντλημένων Σπόρων Κριθαριού BSG (g ανά 100g ξηρής ύλης BSG)

Πρωτεΐνες	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη	Λιγνίνη	Λίπη	Βιβλιογραφία
24,0	43,0	36,9	20,1	10,6	Kanauchi et al., 2001[23]
31,0	9,0	19,0	16,0	9,0	Santos et al., 2003 [24]
15,2	16,8	28,4	27,8	-	Mussatto and Roberto, 2005 [25]
14,2	12,0	40,2	11,5	13,3	Xiros et al., 2008 [26]
24,7	21,7	19,3	19,4	-	Meneses et al., 2013 [27]

Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα 1, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των BSG ποικίλει και αγγίζει το 14-31%, και, παραδοσιακά, φτάνει περίπου το 20% του συνολικού ξηρού τους βάρους. Εξετάζοντας την επίδραση εκχυλίσεων, καθώς επίσης και τις ιδιότητες διαλυτοποίησης, οι περιεχόμενες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται ως υδατοδιαλυτές και διαλυτές σε διαλύματα αλάτων και η πλειοψηφία τους αποτελείται από αλβουμίνες, γλοβουλίνες, γλουτελίνες και ορδεΐνες, οι οποίες μάλιστα απαντώνται σε ποσοστό 60%. Τα απαραίτητα αμινοξέα, που περιέχονται στα BSG συγκροτούν το 30% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη λυσίνη, να διατηρεί το 14,3% της ποσότητας αυτών, τη λευκίνη το 6,12%, τη φαινυλαλανίνη το 4,64% και την ισολευκίνη το 3,31%. [22], [28] Συμπεραίνεται λοιπόν πως οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού είναι μία ιδανική πηγή πρωτεϊνών, καθώς όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1, μια πηγή απομόνωσης πρωτεϊνών θα πρέπει να αποτελείται από ποιοτικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο, το οποίο καθορίζεται από την παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων.

Τα μεταλλικά στοιχεία, που περιέχονται στα BSG ανά 100 g ξηρού βάρους, ανέρχονται σε 0,46% φώσφορο, 0,24% μαγνήσιο, 0,22% ασβέστιο και 0,14% πυρίτιο, ενώ οι αντίστοιχες περιεκτικότητες για το κριθάρι είναι 0,24%, 0,08%, 0,06%, 0,05%. [22]

Επίσης, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού είναι ιδιαίτερα πλούσιοι σε φυτικές ίνες, δηλαδή σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Καλύπτουν περίπου το 50% της σύστασής τους. Οι φυτικές ίνες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη διατροφή. Η ημικυτταρίνη αποτελείται κυρίως από αραβινοξυλάνη, η οποία μάλιστα συγκροτεί και το 40% της πρώτης ύλης σε ξηρό βάρος. [22]

Ένα συστατικό που, επίσης, κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη δομή των BSG, είναι η λιγνίνη, η οποία όπως γίνεται αντιληπτό, αντιπροσωπεύει το 10-28% του συνολικού βάρους τους. Η λιγνίνη είναι ένα μακρομόριο με περίπλοκη δομή, στο οποίο οφείλεται η σταθερότητα των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων. Είναι, επίσης, πολύ χρήσιμη διατροφικά και εντάσσεται στις διατροφικές φυτικές ίνες. [22]

Λαμβάνοντας υπόψιν τον Πίνακα 1, παρατηρείται, πως το σύνολο των BSG, καλύπτουν τα λιπίδια και τα λιπαρά οξέα, με το ποσοστό τους, να αγγίζει το 9-13,3%. Αυτή η ποσότητα, υπερβαίνει τις

αντίστοιχες στα άλευρα σίτου και στα άλευρα ολικής άλεσης. Τα λιπίδια, κατέχουν σημαντικό ρόλο στη δομή των ψωμιών, μιας και προσδίδουν αυξημένο όγκο, απαλότητα και βελτιωμένη ψίχα, ενώ συμβάλλει και στις μηχανικές ιδιότητες τους, μιας και αυξάνουν την ευκαμψία τους. [29]

3.1.3 Συντήρηση-Αποθήκευση

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού που παράγονται περιέχουν περίπου 70-80% υγρασία. Το γεγονός αυτό δημιουργεί δύο προβλήματα σχετικά με την αποθήκευση και τη μεταφορά τους. Αρχικά, το μεγάλο ποσοστό της υγρασίας που περιέχουν καθιστά δύσκολη τη μεταφορά τους λόγω κόστους και επίσης είναι ο καθοριστικός λόγος που τα BSG αξιοποιούνται απευθείας ως ζωοτροφή στην περιοχή στην οποία παράγονται. Το δεύτερο πρόβλημα που δημιουργείται, εξαιτίας του υψηλού περιεχομένου της υγρασίας, είναι η χαμηλή σταθερότητα της πρώτης ύλης, μιας και ο συνδυασμός της υγρασίας με τα υψηλά περιεχόμενα σε πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες καθιστούν τα BSG ευάλωτα στη μικροβιακή ανάπτυξη και στην αλλοίωσή τους. Ύστερα από έρευνα, παρατηρήθηκε πως η αποθήκευση των BSG σε θερμοκρασία δωματίου για 30 ημέρες επέφερε την ανάπτυξη 8 διαφορετικών μυκητιακών γενών. Μία επιπλέον έρευνα έδειξε πως οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, ενώ στο στάδιο της παραγωγής τους μπορούν να θεωρηθούν ως ένα μικροβιολογικά σταθερό προϊόν και εντός των αποδεκτών ορίων, η ανάπτυξη αναερόβιων και μικροαεροφιλικών βακτηρίων υποδεικνύει πως είναι επιρρεπή στην ταχεία ανάπτυξη της μικροχλωρίδας. Συνεπώς, εάν τα BSG χρησιμοποιηθούν σε μεταγενέστερο στάδιο από την παραγωγή τους, προκύπτει η αναγκαιότητα να αποθηκευτούν σε κατάλληλες συνθήκες και συγκεκριμένα αφού πρώτα έχει μειωθεί η περιεχόμενη υγρασία τους στο 10%.

Έχουν εξεταστεί διάφορες τεχνικές για την καταλληλότητά τους, ως προς τη διατήρηση των BSG. Η χρήση διαλυμάτων οξέων, όπως είναι το γαλακτικό, το αιθανικό, το μεθανικό και το βενζοϊκό, ως συντηρητικά έχει μελετηθεί, με τα δύο τελευταία να είναι τα επικρατέστερα. Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποιος υποχρεωτικός κανονισμός που να επιβάλλει την επεξεργασία των BSG με στόχο τη διατήρησή τους για την αξιοποίησή τους στην ανθρώπινη διατροφή.

Για τη συντήρηση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού σε μαζικό επίπεδο, έχει μελετηθεί ένα σύνολο φυσικών διεργασιών, όπως είναι η ξήρανση σε φούρνο, η λυοφιλίωση, η κατάψυξη τους και η χρήση υπέρθερμου ατμού. Η κατάψυξη των τόσο μεγάλων ποσοτήτων BSG αποδεικνύεται ασύμφορη λόγω του τεράστιου όγκου διαχείρισης. Για το λόγο αυτό και αναζητούνται τρόποι για άμεση απομάκρυνσή τους, όπως είναι η διάθεσή τους ως ζωοτροφή. Τέλος, η ξήρανση με τη χρήση υπέρθερμων ατμών βρίσκεται σε πλεονεκτική θέση σε σύγκριση με τις παραπάνω, καθώς παρέχει τη δυνατότητα μεγαλύτερης απόδοσης της διεργασίας και της ανάκτησης ωφέλιμων οργανικών ενώσεων. [22]

3.1.4 Αξιοποίηση-Επεξεργασία

Χρήση των BSG ως βρώσιμη πρώτη ύλη

Μέχρι πρότινος, τα BSG χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο ως ζωοτροφή, χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες, σε συνδυασμό με το χαμηλό τους κόστος. Αποτελούν μια εξαιρετική βρώσιμη πρώτη ύλη για τα μηρυκαστικά μιας και μπορούν να συνδυαστούν με οικονομικές πηγές αζώτου, όπως είναι η ουρία, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην παραγωγή γάλατος, αυξάνοντας τόσο τις ποσότητες που παράγονται όσο και των λιπαρών του γάλακτος, χωρίς να επηρεάζει τη γονιμότητά τους και τα φυσιολογικά επίπεδα της συγκέντρωσης του

πλάσματος του αίματός τους. Ενώ, τα BSG είναι ευρέως διαδεδομένα ως ζωοτροφή για θηλαστικά, σε έρευνα που έχει διεξαχθεί, παρατηρήθηκε πως η χρήση τους ως μερικός αντικαταστάτης του πίτουρου που προέρχεται από ρύζι, για την ανάπτυξη ψαριών, οδήγησε στη γρηγορότερη ανάπτυξή τους. [15]

Εκτός από μία εξαιρετική πηγή ζωοτροφής, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, πλέον, θεωρούνται ένα χρήσιμο υλικό και για την ανθρώπινη διατροφή. Ευρέως διαδεδομένη είναι η ένταξή τους σε προϊόντα της βιομηχανίας αρτοποιίας, όπως είναι ψωμιά, μπισκότα, κέικς, νιφάδες, σνακς, ωστόσο θα πρέπει αρχικά να αλεστεί σε μορφή σκόνης λόγω του μεγάλου μεγέθους των κόκκων. Επιπλέον, το σκούρο τους χρώμα και η πιθανότητα να επηρεαστεί η γεύση και η υφή των τελικών προϊόντων ύστερα από την ενσωμάτωση των BSG στη συνταγή τους, οδηγεί στην αναγκαιότητα πρόσμιξης των υλικών με μικρό ποσοστό από αυτά. Έρευνες έχουν δείξει πως η ένταξη ποσότητας, ίση με 10%, των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού για την παρασκευή ψωμιού, οδήγησε στην αύξηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης του σε 50%, των απαραίτητων αμινοξέων σε 10% και των φυτικών ινών στη διπλάσια ποσότητα, μειώνοντας το θερμιδικό του φορτίο. [15] Επιπλέον, όμως, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, έχουν χρησιμοποιηθεί και ως υποκατάστατο λιπαρών ουσιών με την ιδιότητα της αύξησης των φυτικών ινών σε λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης, οδηγώντας και σε ένα αποδεκτά γευστικό αποτέλεσμα. Ακόμη ένα παράδειγμα χρήσης των BSG είναι για την παραγωγή τραχανά, γεγονός το οποίο οδήγησε στην παρασκευή σούπας με πολύ καλές ιδιότητες, και παρά τις οποιοσδήποτε αστοχίες σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, το προϊόν αποδείχθηκε πλούσιο διατροφικά. [30]

Η αναγκαιότητα ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών προς εμπλουτισμό των τροφών έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση παραπροϊόντων της βιομηχανίας, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Έτσι, λοιπόν, οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, χάρη στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, φυτικές ίνες και πρωτεΐνες, αποδεικνύονται ένα εξαιρετικό προϊόν άντλησης των παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, πρωτεΐνες, φλαβονοειδή, φερουλικά οξέα και p-κουμαρικά οξέα, απομονώνονται με διάφορες μεθόδους εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης στερεού υγρού, της αλκαλικής, της υποβοηθούμενης με μικροκύματα και με ένζυμα, προκειμένου να ενταχθούν σε τρόφιμα και να αυξήσουν τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, αντικαθιστώντας τα τεχνητά αντιοξειδωτικά μέσα. [30]

Χρήση των BSG προς παραγωγή ενέργειας

Μια πιθανή εναλλακτική για παραγωγή ενέργειας, αξιοποιώντας τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού, είναι η χρήση τεχνολογιών θερμικής μετατροπής, όπως είναι η καύση και η πυρόλυση. Τα BSG έχουν υψηλή θερμογόνο δύναμη και προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμη ύλη, θα πρέπει προηγουμένως να αφαιρεθεί σημαντικό ποσοστό της υγρασίας τους. Η θερμότητα που παράγεται από την καύση των BSG είναι ικανή για να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις της ζυθοποιίας, όμως θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πως η καύση τους, μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση σωματιδίων και τοξικών αερίων που περιέχουν άζωτο και διοξείδιο του θείου. [30]

Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη στερεού καυσίμου, δηλαδή πλακετών ξυλάνθρακα με τη χρήση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού. Για αυτή την παρασκευή, τα BSG υπέστησαν ξήρανση και τους ασκήθηκε πίεση. Οι πλακέτες που δημιουργούνται κατά αυτόν τον τρόπο, είναι πλούσιες σε ασβέστιο, μαγνήσιο και φώσφορο και έχουν υψηλό θερμιδικό περιεχόμενο. [15]

Εκτός των παραπάνω, έχει μελετηθεί και η παραγωγή βιοαερίου από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού, το οποίο περιλαμβάνει 55-65% μεθάνιο και 35-45% διοξείδιο του άνθρακα. Για την παραγωγή βιοαερίου μεσολαβούν τα στάδια της υδρόλυσης και της μεθανογένεσης. Στο στάδιο της υδρόλυσης, πραγματοποιείται η πλήρης αποικοδόμηση της ύλης λαμβάνοντας υπόψιν κατάλληλες συνθήκες με στόχο την επίτευξη των βέλτιστων αποδόσεων, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο, όξινοι μικροοργανισμοί, μετατρέπουν τα μακρομόρια που έχουν προκύψει από την υδρόλυση σε πτητικά οξέα, τα οποία με τη σειρά τους με τη βοήθεια μεθανογενών βακτηρίων μετατρέπονται σε μεθάνιο. Σύμφωνα με τις έρευνες, έχει αποδειχθεί πως η συνολική απόδοση της αναερόβιας χώνευσης ύστερα από 15 μέρες είναι 3476 cm³ βιοαερίου στα 100 γραμμάρια BSG, ενώ η απόδοση σε μεθάνιο, ανέρχεται σε 98 m³ για κάθε τόνο BSG. [30]

Χρήση των BSG σε βιοτεχνολογικές διεργασίες

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, χάρη στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε σημαντικά βιοδραστικά συστατικά, όπως είναι οι πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται με επιτυχία ως υποστρώματα σε καλλιέργειες των ειδών *Pleurotus*, *Agrocybe* και *Lentinus*. Πιο συγκεκριμένα, για το είδος *Pleurotus Ostreatus* τα BSG αποδεικνύονται ως ένα πολύ θρεπτικό υπόστρωμα, τόσο για την υψηλή τους περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όσο και για τη μεγάλη ποσότητα υγρασίας και των φυσικών ιδιοτήτων τους. Εκτός, όμως, από τη χρήση τους ως υποστρώματα για την ανάπτυξη καλλιεργειών, τα BSG χρησιμοποιούνται επίσης και για την παραγωγή εμπορικών ενζύμων επονομαζόμενα koji. Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, χάρη στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε άζωτο και τις ενεργειακές τους δυνατότητες, είναι ιδανικά υποστρώματα για την παραγωγή ενζύμων, όπως είναι οι ξυλανάσες, οι προτεάσες και οι αμυλάσες. [15]

Λοιπές χρήσεις των BSG

Οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, χάρη στο χαμηλό περιεχόμενό τους σε τέφρα και το αυξημένο ποσοστό ινώδους υλικού που συγκροτείται από τις φυτικές ίνες, αποδείχθηκε καλή πρώτη ύλη για την παραγωγή οικοδομικών υλικών. Μέσω της χρήσης τους αυξήθηκε η ξηρότητα των τούβλων, χωρίς να αλλοιώνονται τα εμφανισιακά τους χαρακτηριστικά. Κατά αυτόν τον τρόπο τα BSG αποτέλεσαν ιδανική λύση για να αντικαταστήσουν το πριονίδι στην παρασκευή οικοδομικών υλικών. Τα χαρακτηριστικά αυτά των BSG οδήγησαν και στην αξιοποίησή τους για την παραγωγή χαρτιού. Τέλος έχει μελετηθεί η χρήση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού ως προσροφητικό μέσο για την απομάκρυνση πτητικών οργανικών ουσιών από τα αέρια απόβλητα. [15]

3.2 Μαγιά

Η παραγωγική διαδικασία της μύρας οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υπολειμμάτων εξαντλημένης μαγιάς. Χαρακτηριστικά, έχει υπολογιστεί πως για κάθε 100 λίτρα παραγόμενης μύρας, προκύπτουν 0,7-1,1 κιλά εξαντλημένης μαγιάς BSY. [31] Τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς αποτελούν το δεύτερο πιο σημαντικό παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής μύρας, το οποίο αποδεικνύεται πως διαθέτει χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο, χαμηλά επίπεδα λιπαρών και υδατανθράκων. Ωστόσο, είναι μία πρώτη ύλη πλούσια σε φυτικές ίνες και κυρίως β-γλουκάνες, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. [32] Τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς είναι μια οικονομική πρώτη ύλη που αξιοποιείται ως ζωοτροφή και διαθέτει πρωτεΐνες σε ποσοστό 45-60%. Επιπλέον, είναι μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή σε νουκλεϊκά οξέα και μάλιστα περιέχει νουκλεϊκά οξέα σε μεγαλύτερο ποσοστό από προϊόντα κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην

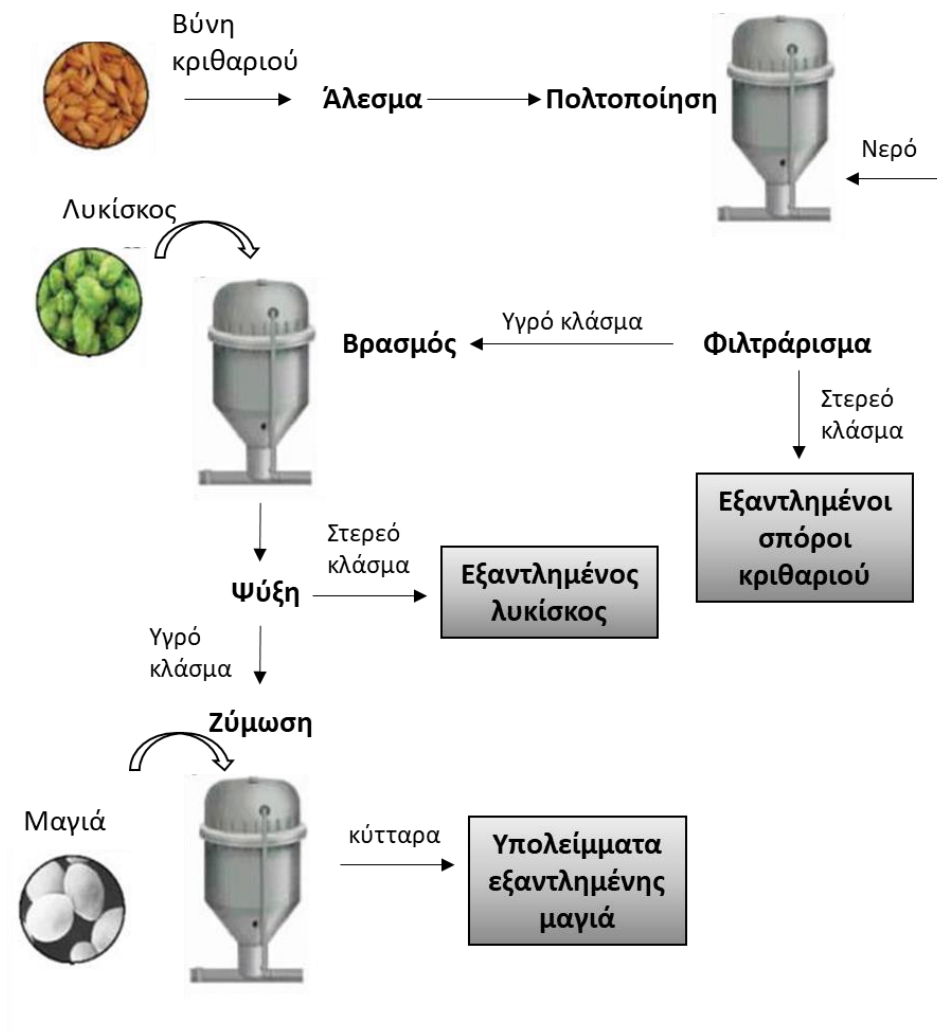
αναγκαιότητα για μείωση του περιεχομένου αυτού, περίπου στο 2% προκειμένου να αποτελέσει μία πρώτη ύλη χρήσιμη και υγιεινή για την ανθρώπινη διατροφή. Νέες έρευνες μελετούν την απομόνωση ωφέλιμων βιοδραστικών συστατικών από τα υπολείμματα της μαγιάς. [33]

3.2.1 Παραγωγή

Η παραγωγική διαδικασία της μπίρας περιλαμβάνει πολλά στάδια που βασίζονται σε ανεπτυγμένες τεχνικές, συνδυασμένες με την παράδοση. Περιληπτικά, κατά την παραγωγή της μπίρας, λαμβάνουν χώρα χημικές και βιοχημικές διεργασίες και τρεις διαφορετικοί διαχωρισμοί στερεού υγρού.

Όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, το κριθάρι είναι το δημητριακό που χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, στη διαδικασία παραγωγής μπίρας ως πηγή αμύλου, το οποίο θα πρέπει να υποστεί τη διαδικασία της βυνοποίησης προκειμένου να διαλυθεί το άμυλο. Τα στάδια της βυνοποίησης είναι η διαβροχή, η εκβλάστηση και η ξήρανση. Στη διαδικασία αυτή, συμμετέχουν ένζυμα τα οποία διασπούν το άμυλο και το προετοιμάζουν για περαιτέρω επεξεργασία, στην οποία παίρνουν μέρος άλλα ένζυμα που μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στη δημιουργία του μούστου (ζυθογλεύκους) που βράζει. Στο στάδιο του βρασμού, προστίθεται ο λυκίσκος προκειμένου να συμβάλλει στην πρόσδοση πικρής γεύσης, στην προστασία από βακτηριακή αλλοίωση και στο σχηματισμό αφρού.

Στο στάδιο της ζύμωσης, προστίθεται η μαγιά η οποία κατέχει το ρόλο της μετατροπής των σακχάρων σε αλκοόλ και της παραγωγής του διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, συμβάλλει στη δημιουργία και άλλων ενώσεων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος της μπίρας. Η μαγιά, χρησιμοποιείται πολλαπλάσιες φορές κατά την παραγωγική διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται 4-6 φορές και από το ένα στάδιο της ζύμωσης, απομονώνεται για να αξιοποιηθεί στο επόμενο. Όπως είναι αναμενόμενο τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς, είναι ένα πολύ σημαντικό σε όγκο παραγωγής παραπροϊόν της ζυθοποιίας και χρήζει ερευνών προς την αποδοτική αξιοποίησή του. [34]



Εικόνα 4. Διάγραμμα ροής δημιουργίας παραπροϊόντων ζυθοποιίας [35]

3.2.2 Χημική Σύσταση

Η μαγιά, όπως αναφέρθηκε, είναι το δεύτερο παραπροϊόν της ζυθοποιίας, που παράγεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες και έχει μεγάλο ενδιαφέρον ως παραπροϊόν χρήσιμο προς περαιτέρω αξιοποίηση εξαιτίας της πλούσιας σύνθεσής της. Ως προς τη στοιχειακή της σύνθεση τα υπολείμματα της μαγιάς, είναι πλούσια σε άνθρακα, το οποίο μάλιστα αποτελεί και το 50% του ξηρού τους βάρους. Επιπλέον, το οξυγόνο απαντάται στα κύτταρά τους σε ποσοστό περίπου 30-35%, το άζωτο σε 5% και τέλος ο φώσφορος κατέχει το 1% του ξηρού τους βάρους. Σε ό,τι αφορά στη σύσταση των υπολειμμάτων της εξαντλημένης μαγιάς, ως προς το περιεχόμενο των μακρομορίων, αυτή εξαρτάται από την προέλευσή τους και από τα στάδια επεξεργασίας που έχει υποστεί. [35]

Επιπλέον, φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη η παραγωγή και αξιοποίηση των εκχυλισμάτων των υπολειμμάτων μαγιάς προκειμένου να απομονωθούν βιοδραστικά συστατικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικά σε τρόφιμα. [33] Παρακάτω, στον Πίνακα 2 παρατίθεται συγκεντρωμένη η σύσταση της BSY, όπως έχει προκύψει από διάφορες βιβλιογραφικές πηγές. ([32], [33], [35])

Πίνακας 2. Χημική Σύσταση των Υπολειμμάτων Εξαντλημένης Μαγιάς (BSY) και εκχυλισμάτων μαγιάς (g ανά 100g ξηρής ύλης BSY)

Πρωτεΐνες	Υδατάνθρακες	Νουκλεϊκά Οξέα	Λιπίδια	Φυτικές Ίνες	Βιβλιογραφία
48-50	36-42	-	1	3	Mussatto, 2009 [35] ^α
64,1	12,9	3,79	1,32	-	Vieira et al., 2016 [32] ^β
62,5-63,8	-	-	0,1-0,2	-	Podpora et al., 2016 [33] ^β

^α Σύσταση υπολειμμάτων εξαντλημένης μαγιάς, ^β Σύσταση εκχυλισμάτων εξαντλημένης μαγιάς

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 2, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, τόσο στα ίδια τα κύτταρα των υπολειμμάτων της μαγιάς, όσο και στα εκχυλίσματα που προκύπτουν από αυτά, είναι ιδιαίτερα αυξημένο, γεγονός το οποίο αποδίδεται και στην αυξημένη παρουσία απαραίτητων αμινοξέων. Έτσι, λοιπόν, προκύπτει το συμπέρασμα πως η μαγιά και τα εκχυλίσματά της, αποδεικνύονται μια χρήσιμη πηγή πρωτεΐνης για τη βιομηχανία τροφίμων. [32], [35]

Επιπλέον, έχει υπολογιστεί πως η συνολική περιεκτικότητα των υπολειμμάτων μαγιάς, σε μεταλλικά στοιχεία, είναι ίση με το 5-10% του ξηρού βάρους των κυττάρων της, με το νάτριο και το φώσφορο να κατέχουν τα μεγαλύτερα ποσοστά και συγκεκριμένα το 1,71% και 1,43% αυτών. [35] Σε έρευνες σχετικά με το στοιχειακό προφίλ των εκχυλισμάτων μαγιάς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και τα δεύτερα, είναι εξίσου εμπλουτισμένα σε μεταλλικά στοιχεία με το κάλιο αυτή τη φορά να κυριαρχεί, καλύπτοντας το 9,15% του ξηρού βάρους των εκχυλισμάτων και στη συνέχεια να ακολουθούν το νάτριο με 1,23%, το μαγνήσιο με 0,27% και τέλος το ασβέστιο με το μικρότερο ποσοστό της τάξεως του 0,03%. [32]

Τέλος, έχει μελετηθεί και η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων που έχουν προκύψει από τα υπολείμματα τις μαγιάς. Διαπιστώνεται, πως τα εκχυλίσματα της BSY είναι μια πολύ σημαντική διατροφική πηγή άντλησης της βιταμίνης B3 ή διαφορετικά της νιασίνης, η οποία εμπεριέχεται σε ποσότητα 77,2 mg στα 100 g ξηρού βάρους. Η βιταμίνη αυτή συμβάλλει σε ποικίλες μεταβολικές δραστηριότητες, καθώς επίσης διαθέτει αντιοξειδωτικό ρόλο και χρησιμοποιείται για τις αποτοξινωτικές της ιδιότητες. Εκτός της B3, τα εκχυλίσματα της BSY, είναι πλούσια και σε βιταμίνη B6 (πυριδοξίνη), με την τιμή της να ανέρχεται σε 55,1 mg. Η πυριδοξίνη είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία πολλών ενζύμων που καταλύουν χημικές αντιδράσεις στο ανθρώπινο σώμα και ιδίως αυτών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των αμινοξέων. Τέλος, στα εκχυλίσματα της BSY μετρήθηκε και η ύπαρξη της βιταμίνης B9 δηλαδή του φολικού οξέος, το οποίο συμμετέχει σε διάφορες διεργασίες των κυττάρων, όπως είναι η σύνθεση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. [32]

3.2.3 Αξιοποίηση-Επεξεργασία

Αν συγκριθεί το διατροφικό περιεχόμενο (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ένζυμα, βιταμίνες, αμινοξέα) των υπολειμμάτων της μαγιάς σε σχέση με αυτό των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού, διαπιστώνεται πως η BSY, υπερτερεί. Ωστόσο, η άμεση αξιοποίηση της σε προϊόντα διατροφής είναι περιορισμένη, καθώς περιέχει μεγάλο ποσοστό νουκλεϊκών οξέων, και ιδίως ριβονουκλεοτιδίων

(RNA), που στο ανθρώπινο σώμα μεταβολίζονται σε ουρικό οξύ, το οποίο ενοχοποιείται για την πρόκληση αρθρίτιδας. Παρά ταύτα, το πλούσιο διατροφικό της περιεχόμενο, όπως ειπώθηκε την καθιστά ως μία πρώτη ύλη σημαντική για επαναχρησιμοποίηση και ιδιαίτερα σε βιοτεχνολογικές διεργασίες. [35]

Χρήση της BSY ως τροφή για ψάρια

Τα υπολείμματα της μαγιάς έχουν αναγνωριστεί ως ένα πολύ καλό υποκατάστατο των ζώντων οργανισμών και του ιχθυάλευρου που χρησιμοποιούνται ως ψαροτροφή. Χαρακτηριστικά, έχει υπολογιστεί πως η BSY μπορεί να αντικαταστήσει επάξια το 50% των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στο ιχθυάλευρο, χωρίς να προκαλείται καμία βλάβη στην ανάπτυξη των ψαριών. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η μερική αντικατάσταση μέρους της ποσότητας των τροφών που προορίζονται για τα ψάρια και έχει αποδειχθεί πως η ένταξη της BSY, σε ποσοστό 30% στη διατροφή τους, ενίσχυσε τη δράση της τροφής. Έτσι, τα υπολείμματα της μαγιάς χρησιμοποιούνται, όπως κάθε πρωτεϊνούχα πρώτη ύλη ως ενισχυτικό σε σκευάσματα τροφής για τα ψάρια, και για σκευάσματα σαλμονίδας. Για τη χρήση των υπολειμμάτων της μαγιάς ως τροφή σε πέστροφες είναι απαραίτητη η διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς, μιας και το κυτταρικό τοίχωμα της έχει συνδεθεί με τη μείωση της πεπτικότητας του αζώτου.

Τα υπολείμματα της μαγιάς έχει αποδειχτεί πως περιέχουν συστατικά τα οποία διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Τέτοιες ουσίες είναι οι β-γλυκάνες, τα νουκλεϊκά οξέα και οι ολιγοσακχαρίτες. Η ένταξή τους στη διατροφή των ψαριών, έχει συνδεθεί με την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης και της ανάπτυξής τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είδους ψαριού, στο οποίο τη διατροφή εντάχθηκε η BSY, είναι το γραμμωτό λαυράκι, το οποίο αναπτυσσόταν καλύτερα και μάλιστα εμφάνισε αντοχή στην προσβολή από τη λοίμωξη που προκαλεί ο *Streptococcus iniae*. Η απαρίθμηση των παραδειγμάτων χρήσης των υπολειμμάτων της μαγιάς στη διατροφή των ψαριών, έχει αποδείξει τόσο την αυξημένη απόδοση θρεπτικών συστατικών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των ψαριών, όσο και τη βελτιωμένη επίδρασή τους στην αντίσταση μόλυνσης των ειδών από μικροοργανισμούς.

Τέλος, η BSY χρησιμοποιείται επίσης και ως τροφή για την ανάπτυξη του σκουληκιού, το ονομαζόμενο, νηματώδες *Panagrellus redivivus* και αποτελεί σημαντική τροφή για πολλά είδη ψαριών. [31]

Χρήση της BSY ως υπόστρωμα ανάπτυξης μικροοργανισμών

Η υψηλή περιεκτικότητα των υπολειμμάτων της μαγιάς σε πρωτεΐνες, στο σύμπλεγμα βιταμινών Β και σε μεταλλικά στοιχεία, την καθιστούν ως μία πρώτη ύλη, ιδιαίτερα χρήσιμη-καθώς και τα εκχυλίσματά της- για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Έτσι, λοιπόν, έχει προκύψει η ανάγκη για μελέτη της ολόκληρης ή της μερικής ένταξης των εκχυλισμάτων BSY σε υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Χαρακτηριστικά, έχει μελετηθεί η ανάπτυξη των Γαλακτοβάκιλων και των *Pediococcus*.

Η διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη στην αγορά, για την παρουσία τροφίμων με αυξημένες λειτουργικές ιδιότητες, συνέβαλε στην ανάπτυξη του προϊόντος που βασίζεται στο χυμό παντζαριού, ο οποίος έχει μεγάλο διατροφικό ενδιαφέρον για την ανθρώπινη διατροφή. Το προϊόν αυτό παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από τα υπολείμματα της μαγιάς και για τη ζύμωση χρησιμοποιήθηκαν οι *Lactobacillus plantarum* A112, *L. Acidophilus* BGSJ15-3 και *L. Acidophilus* NCDO1748. Η χρήση

γαλακτοβάκιλων σε διεργασίες ζύμωσης είναι μια διαδεδομένη τεχνική, και η παρουσία των εκχυλισμάτων της BSY είναι καθοριστική για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αυτών των βακτηρίων. Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για την παρασκευή χυμού από καρότο.

Επιπλέον έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί, με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας αυτολύματα εξαντλημένης μαγιάς και ανασυνδυασμένο το βακτήριο *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η υδρόλυση της BSY, ως μία πηγή αζώτου για την παραγωγή του σουκινικού οξέος από το *Actinobacillus succinogenes* NJ113 για την ανάπτυξη πιο οικονομικού και αποδοτικού μέσου ζύμωσης. Προκειμένου να υδρολυθεί η BSY και να απελευθερωθούν τα θρεπτικά συστατικά της, χρησιμοποιήθηκαν τόσο η διεργασία της αυτόλυσης, όσο και της ενζυμικής υδρόλυσης και διαπιστώθηκε πως η ενζυμική υδρόλυση απεδείχθη πιο αποδοτική, χάρη στην εμφάνιση μεγαλύτερης ποσότητας σουκινικού οξέος και της παραγωγής περισσότερων κυττάρων. [31]

Χρήση της BSY ως πηγή άντλησης συστατικών τροφίμων

Εκτός από τις χρήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα υπολείμματα της μαγιάς, χρησιμοποιούνται ευρέως για την απομόνωση χρήσιμων βιοδραστικών συστατικών, τα οποία μπορούν να ενταχθούν στα συστήματα τροφίμων. Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί και η αξιοποίηση της BSY για την παραγωγή βρώσιμων εκχυλισμάτων μαγιάς για να χρησιμοποιηθούν ως αρωματικά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα BSY που έχουν υποστεί ξήρανση και υφίστανται ενζυμική επεξεργασία. Τα αρώματα που προκύπτουν, αξιοποιούνται σε προϊόντα κρέατος, σάλτσες, σούπες, σνακς, κ.τ.λ.

Η β-γλυκάνη, που λαμβάνεται από τα υπολείμματα της μαγιάς, χρησιμοποιείται ως διογκωτικό μέσο, που συγκρατεί το νερό ή δεσμεύει το έλαιο και ως σταθεροποιητής και συγκεκριμένα γαλακτοματοποιητής. Η BSY, στην παρούσα μελέτη, υπέστη αρχικά αυτόλυση και ομογενοποιήθηκαν τα κύτταρά της, ύστερα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση αρχικά με αλκαλικό μέσο και ύστερα όξινο και τέλος εφαρμόστηκε ξήρανση με ψεκασμό. Ύστερα από σύγκριση των ομογενοποιημένων και των μη ομογενοποιημένων κυττάρων τις BSY, τα πρώτα αποδείχθηκε πως έχουν μεγαλύτερο περιεχόμενο σε β-γλυκάνη και καλύτερες ιδιότητες φαινόμενου ιξώδους. [31]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΥΘΟΠΟΙΙΑΣ

4.1 Ξήρανση Πρώτης Ύλης

Η φυσική διεργασία μέσω της οποίας απομακρύνεται το νερό από διάφορα υλικά, ονομάζεται ξήρανση. Η ξήρανση χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, αποτελώντας μία σημαντική διεργασία για την παραγωγή επεξεργασμένων προϊόντων. [36] Η ξήρανση βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα προϊόντων, όπως είναι τα λαχανικά, τα φρούτα, τα ψάρια, το κρέας, τα δημητριακά και τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και οδηγεί στη δημιουργία σταθερών προϊόντων όπως είναι οι σκόνες ή προϊόντων που προορίζονται για σνακς, δημητριακά, σούπες κ.τ.λ. [37]

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η συντήρηση των τροφίμων και η επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους, είναι αναγκαίος ο περιορισμός της ανάπτυξης και της δράσης των μικροοργανισμών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μείωση της περιεχόμενης υγρασίας τους, μέσω της ξήρανσης. [38] Η ξήρανση συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας του νερού κάτω από την τιμή 0,5. Στις τιμές αυτές αναστέλλεται η ανάπτυξη των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Παράλληλα εμποδίζεται η ενζυμική δραστηριότητα και ελαχιστοποιείται η ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του τροφίμου. Επιπλέον, όμως, η ξήρανση χρησιμοποιείται και για τη μείωση του όγκου και του βάρους των αγροτικών παραπροϊόντων, προκειμένου να διευκολυνθεί η μεταφορά, η αποθήκευσή τους και η αξιοποίησή τους. Τα αφυδατωμένα τρόφιμα, διατηρούνται καλύτερα εν συγκρίσει με τα νωπά τρόφιμα και η ενυδάτωσή τους καθίσταται πιο εύκολη όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά τροφίμων.

Η ξήρανση πρέπει να εφαρμόζεται με τέτοιον τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται η κάλυψη κάποιων απαιτήσεων, όπως είναι η διατήρηση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου, η ασφάλεια του τροφίμου, η μείωση της ενέργειας και του περιεχόμενου νερού. Η επιλογή της μεθόδου ξήρανσης που θα εφαρμοστεί ή ο συνδυασμός αυτών, εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες :

- Τα χαρακτηριστικά των φρέσκων προϊόντων
- Το επιθυμητό τελικό επίπεδο υγρασίας
- Η ποιότητα και οι ιδιότητες των τελικών προϊόντων
- Η τελική χρήση των προϊόντων
- Το κόστος
- Οι ενεργειακές απαιτήσεις [39]

Για τους παραπάνω λόγους, έχει προκύψει η ανάγκη για ανάπτυξη διάφορων τύπων ξηραντήρων.

4.1.1 Τύποι Ξηραντήρων

Οι ξηραντήρες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους αδιαβατικούς και τους μη αδιαβατικούς. Στην πρώτη κατηγορία η θερμότητα εξάτμισης προέρχεται από ρεύμα αέρα, το οποίο απομακρύνει συγχρόνως την εξατιζόμενη υγρασία. Στους μη αδιαβατικούς ξηραντήρες η θερμότητα παρέχεται στο προϊόν εξαιτίας της επαφής με μία επιφάνεια μέσω του φαινομένου της ακτινοβολίας ή της αγωγής. Η θερμοκρασία της επιφάνειας του προϊόντος αυξάνεται, λόγω της επαφής με την πηγή θερμότητας και η υγρασία απομακρύνεται είτε με κενό είτε μέσω κάποιου αερίου.

Οι αδιαβατικοί ξηραντήρες χωρίζονται και σε περαιτέρω κατηγορίες, δηλαδή τους ξηραντήρες με ρεύμα αέρα το οποίο περνά πάνω από την επιφάνεια του τροφίμου και τους ξηραντήρες με αιώρηση σταγονιδίων τροφίμου σε ρεύμα αέρα. Στους πρώτους, το τρόφιμο βρίσκεται ακίνητο πάνω σε ράφια ή μετακινείται διαρκώς δια μέσου του ξηραντήρα. Στους ξηραντήρες με αιώρηση σε αέρα, περιλαμβάνονται οι ξηραντήρες με ψεκάσμο, οι ξηραντήρες πνευματικής μεταφοράς και οι ξηραντήρες ρευστοστερεάς κλίνης.

Στους μη αδιαβατικούς ξηραντήρες, κατατάσσονται και οι ξηραντήρες τυμπάνου, οι ξηραντήρες κενού, και οι θάλαμοι ξήρανσης υπό κατάψυξη. [38]

Μεταξύ των μεθόδων που αναφέρθηκαν, η ξήρανση υπό κατάψυξη, έχει σημαντική βιομηχανική χρήση καθώς οδηγεί σε προϊόντα υψηλής ποιότητας.

4.1.2 Ξήρανση Υπό Κατάψυξη-Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση είναι μια ευρέως διαδεδομένη διεργασία ξήρανσης, η οποία βελτιώνει τα επίπεδα σταθερότητας των φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων. Χρησιμοποιείται κυρίως για προϊόντα που χαρακτηρίζονται από μεγάλη προστιθέμενη αξία. Ο κύκλος της ξήρανσης υπό κατάψυξη χωρίζεται στο στάδιο της κατάψυξης, της πρώιμης ξήρανσης (εξάχνωση του πάγου) και της δευτερογενούς ξήρανσης (απομάκρυνση του αποψυγμένου νερού). [40]

Η ξήρανση υπό κατάψυξη βασίζεται στην εξάχνωση του πάγου από ένα ήδη κατεψυγμένο προϊόν. Πιο συγκεκριμένα, η διεργασία πραγματοποιείται με την αρχική κατάψυξη του υπό επεξεργασία προϊόντος και στη συνέχεια πρόσδοση θερμότητας υπό μειωμένη πίεση που οδηγεί στην εξάχνωση του πάγου. Ονομάζεται λυοφιλίωση, καθώς τα ξηρά προϊόντα που προκύπτουν, είναι πολύ λυόφιλα, με άλλα λόγια απορροφούν εύκολα το νερό. [38]

Η μέθοδος της ξήρανσης υπό κατάψυξη, εμφανίζει πλεονεκτήματα, όπως είναι η ομοιογενής διασπορά των συστατικών που περιέχονται στα ξηρά προϊόντα που προκύπτουν, ενώ παράλληλα διατηρείται και η δομή τους χωρίς να προκαλείται συρρίκνωση ή σκλήρυνση. Επιπλέον, οι ουσίες που έχουν υποστεί λυοφιλίωση, παρουσιάζουν μεγάλους χρόνους ζωής, μιας και μπορούν να αποθηκευτούν σφραγισμένες για να αποφευχθεί η προσρόφηση υγρασίας για χρόνια. Εφόσον δε χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες για την ξήρανση, παρουσιάζει το πλεονέκτημα της αξιοποίησής της για την ξήρανση προϊόντων που παρουσιάζουν θερμοευαισθησία. Παράλληλα, είναι χρήσιμη μέθοδος, μιας και οι γεύσεις και τα αρώματα των προς ξήρανση ουσιών, παραμένουν αναλλοίωτα. Τέλος, τα προϊόντα που έχουν υποστεί ξήρανση υπό κατάψυξη, έχουν την ικανότητα να επαναδιαλυτοποιούνται εύκολα και γρήγορα, μιας και έχουν αποκτήσει πορώδη υφή. Εκτός όμως από τα πλεονεκτήματα, η μέθοδος της λυοφιλίωσης, παρουσιάζει και μειονεκτήματα με το βασικότερο να είναι το γεγονός πως είναι μια δαπανηρή μέθοδος ξήρανσης λόγω του οικονομικού κόστους που παρουσιάζει ο εξοπλισμός (οι αντλίες είναι ακριβές) και των ενεργειακών απαιτήσεων. [41]

4.2 Εκχύλιση Στερεών με Υγρό Διαλύτη

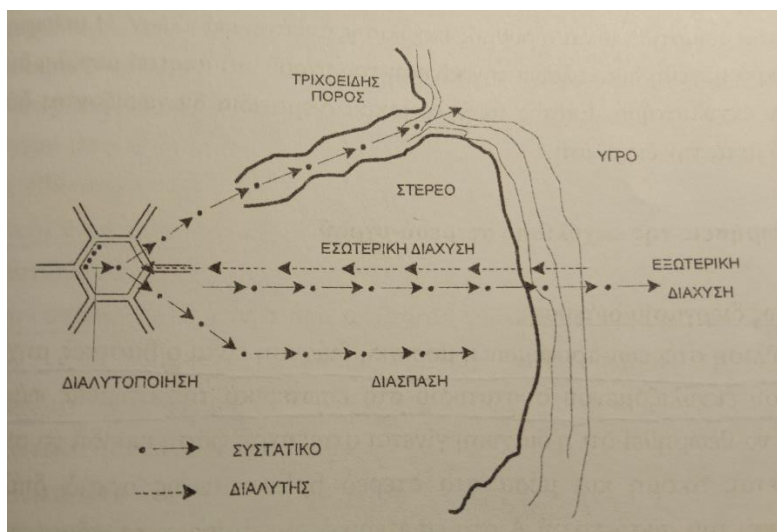
Στη βιομηχανία τροφίμων, η εκχύλιση αφορά, κατά κύριο λόγο, στην εκχύλιση στερεού-υγρού η οποία ονομάζεται και έκπλυση. Η εκχύλιση στερεού-υγρού περιλαμβάνει την απομάκρυνση ενός ή περισσότερων συστατικών από το στερεό τρόφιμο, με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη. Στη διεργασία της εκχύλισης συμμετέχουν τόσο στερεά τρόφιμα, τα οποία από τη φύση τους περιέχουν μία υγρή

φάση, όσο και τρόφιμα τα οποία εμποτίζονται με το διαλύτη. Η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μια διεργασία όπου καθοριστικός μηχανισμός είναι αυτός της μεταφοράς μάζας, μιας και λαμβάνει χώρα μια διαρκής μεταφορά συστατικών, συχνά μέσω περισσότερων από δύο διακριτών φάσεων, υπό μη μόνιμες συνθήκες, αφού κατά τη διάρκειά της, η συγκέντρωση του εκχυλιζόμενου συστατικού στο στερεό μεταβάλλεται διαρκώς. [42]

4.2.1 Αρχές και Μηχανισμοί Εκχύλισης Στερεού-Υγρού

Στην εκχύλιση στερεού-υγρού, όταν το στερεό τρόφιμο έρθει σε επαφή με το διαλύτη, λαμβάνουν χώρα ορισμένα φαινόμενα που οδηγούν στο διαχωρισμό ορισμένων συστατικών από το στερεό τα οποία περνούν στην υγρή φάση, από την οποία και παραλαμβάνονται. Τα φαινόμενα αυτά είναι τα ακόλουθα:

- Διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα του στερεού τροφίμου
- Διαλυτοποίηση του συστατικού που εκχυλίζεται
- Μεταφορά του συστατικού από το εξωτερικό της μήτρας του στερεού
- Μεταφορά του συστατικού από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού στον κύριο όγκο του διαλύτη μέσω του στατικού υμένα που περιβάλλει τη στερεά φάση
- Μετακίνηση του συστατικού με τον όγκο του διαλύτη
- Διαχωρισμός του εκχυλίσματος, δηλαδή του μέρους του διαλύτη με το διαλυμένο συστατικό από το στερεό [42]



Εικόνα 5. Στάδια εκχύλισης συστατικού από στερεά σωματίδια με τη χρήση διαλύτη [42]

Εφόσον η συγκέντρωση του διαλυμένου στερεού μεταβάλλεται, προκύπτει ως συμπέρασμα πως κάθε ένα από τα προαναφερθέντα στάδια, χαρακτηρίζεται από διαφορετικό ρυθμό. Συνεπώς, ο ρυθμός της εκχύλισης καθορίζεται από το στάδιο που κατέχει το βραδύτερο ρυθμό, αυτό είναι και το ελέγχον στάδιο. Στην εκχύλιση στερεού-υγρού, το ελέγχον στάδιο είναι η μεταφορά στο εσωτερικό του τροφίμου.

Τα τρόφιμα παρουσιάζουν την ιδιαιτερότητα ότι η μικροδομή τους παίζει σημαντικό ρόλο στο ρυθμό και την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Μιας και ως επί το πλείστον σε εκχύλιση υποβάλλονται φυτικοί ιστοί, η μικροδομή των τροφίμων συνίσταται από κύτταρα, μεσοκυττάρια διαστήματα και

τριχοειδείς πόρους. Το συστατικό που πρόκειται να εκχυλιστεί, μπορεί να βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου και συνεπώς τα κυτταρικά τοιχώματα και οι μεμβράνες συγκράτησης αποτελούν τον κύριο παράγοντα που αντιστέκεται στη διάχυση. Επιπλέον, παρεμποδιστικός παράγοντας είναι η περιεκτικότητα της λιγνίνης, που σχετίζεται με την προέλευση του ιστού. Συνεπώς, τις περισσότερες φορές είναι ανάγκη να αυξηθεί η διαπερατότητα των κυττάρων, γεγονός το οποίο προκύπτει από θερμική μετουσίωση. Για να αυξηθεί ο ρυθμός της εκχύλισης, αλέθεται η πρώτη ύλη σε μικρότερα σωματίδια προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με το διαλύτη. [42]

4.2.2 Χημική Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Η διάκριση των χημικών εκχυλίσεων, βασίζεται στο διαλύτη που χρησιμοποιείται, ο οποίος μπορεί να είναι το νερό, αλκάλια, οξέα ή οργανικοί διαλύτες. Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών μέσω των πράσινων εκχυλίσεων, οι τελευταίες, συνδυάζονται με τις τεχνικές χημικής εκχύλισης. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των πρωτεϊνών, καθορίζεται και από την ίδια τη φύση της πρώτης ύλης από την οποία προέρχεται. Η πρώτη ύλη που πρόκειται να υποστεί εκχύλιση, επεξεργάζεται κατά κύριο λόγο σε τρία στάδια. Αυτό της απολίπανσης του δείγματος, το κύριο στάδιο της εκχύλισης και τέλος αυτό της καταβύθισης των πρωτεϊνών. Σημαντική κατηγορία των χημικών εκχυλίσεων είναι οι αλκαλικές εκχυλίσεις και οι εκχυλίσεις που βασίζονται σε οργανικό διαλύτη. [43]

4.2.2.1 Αλκαλικές Εκχυλίσεις

Η αλκαλική εκχύλιση βασίζεται στη δράση του αυξημένου pH του διαλύματος, το οποίο ρυθμίζεται είτε με καυστικό νάτριο (NaOH) είτε με καυστικό κάλιο (KOH). Κατά την εκχύλιση με χρήση αλκαλικών μέσων, διασπώνται οι δισουλφιδικοί δεσμοί, οδηγώντας στην αύξηση της απόδοσης των εκχυλίσεων σε πρωτεΐνες. Επιπλέον, ο μηχανισμός του ιονισμού των όξινων και ουδέτερων αμινοξέων, συμβάλλει στην αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Η τεχνική της αλκαλικής εκχύλισης των πρωτεϊνών, παρουσιάζει βελτιωμένα αποτελέσματα τόσο στη βιοδιαθεσιμότητά τους, όσο και στην πέψη τους από τον οργανισμό. [43]

4.2.2.2 Εκχυλίσεις με Χρήση Οργανικών Διαλυτών

Οι οργανικοί διαλύτες κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο τόσο στην απομόνωση πρωτεϊνών, όσο και στην καταβύθισή τους, οδηγώντας στην παρασκευή καθαρών σκευασμάτων πρωτεϊνών. Η χρήση οργανικών διαλυτών ευνοεί την εκχύλιση πρωτεϊνών που διαθέτουν την ικανότητα σύνδεσης με λιπίδια, που έχουν πολικές ή/και μη πολικές πλευρικές αλυσίδες και περιέχουν αρωματικά αμινοξέα. [43]

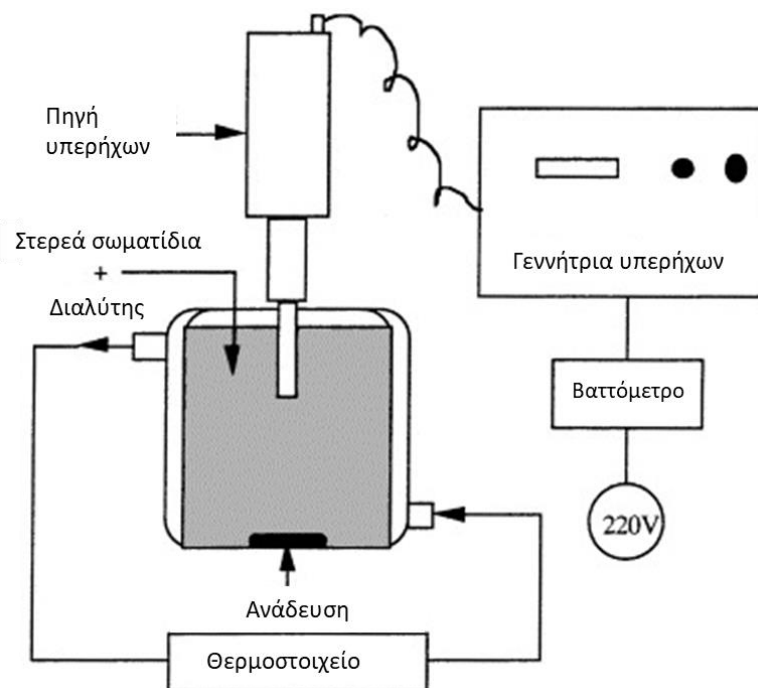
4.2.3 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους

Η βιομηχανία τροφίμων έχει κάνει στροφή στη χρήση εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης, όπως είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE), που αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας και ανάπτυξης. Τα ηχητικά κύματα είναι εκείνα που διαθέτουν συχνότητες μέσα στο εύρος εκείνων των συχνοτήτων που αντιλαμβάνεται η ανθρώπινη ακοή, δηλαδή από 16 Hz έως 20kHz. Οι υπέρηχοι έχουν συχνότητες μεγαλύτερες από 20 kHz και κυρίως οι έρευνες που εφαρμόζονται, περιλαμβάνουν τιμές συχνοτήτων μεταξύ 20-25 kHz. Βασικές παράμετροι που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, είναι η συχνότητα, το μήκος κύματος, το πλάτος και η ένταση του μήκους. Μία τυπική διάταξη υπερήχων, αποτελείται από εκχυλιστήρα κλειστού τύπου,

που διαθέτει αισθητήρα μετατροπής υπερήχων, οι οποίοι εκπέμπονται από μια μικρή επιφάνεια του στελέχους που βυθίζεται απευθείας στη φιάλη που βρίσκεται το δείγμα. [44], [45]

4.2.3.1 Αρχές και Μηχανισμοί Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Υπερήχους

Οι υπέρηχοι περιλαμβάνουν μηχανικά κύματα που διαδίδονται μέσα στο προς εκχύλιση στερεό. Η αρχή λειτουργίας των υπερήχων, στη συγκεκριμένη μέθοδο εκχύλισης, βασίζεται στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης, το οποίο προκαλείται κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των υπερήχων, όταν ένα υπερηχητικό κύμα, συναντά ένα υγρό μέσο και παράγονται διαμήκη κύματα. Το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης, εφαρμόζεται μόνο σε υγρά ή υγρά που περιέχουν διαλυμένα στερεά. Τα διαμήκη κύματα σχηματίζουν στο υγρό περιοχές εναλλασσόμενων κυμάτων συμπίεσης και αραιώσης (διαστολή), τα οποία επάγονται στα μόρια του μέσου. Αυτή η διαστολή, που προκαλείται, δημιουργεί φυσαλίδες στο υγρό και παράγει αρνητική πίεση που μπορεί να φτάσει ακόμη και τα 50 Μρα τοπικά, έντονη θέρμανση και διαρκεί για λίγα δευτερόλεπτα. Όταν επέλθει σταθερή ένταση υπερήχων, δηλαδή ανάμεσα στο σχηματισμό και την κατάρρευση των φυσαλίδων, αποκαθίσταται δυναμική ισορροπία. Στο στάδιο της κατάρρευσης των φυσαλίδων της σπηλαιώσης, που λαμβάνει χώρα κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα της βιομάζας, δημιουργούνται μικροπίδακες και κύματα κρούσης λόγω της υψηλής πίεσης και της αύξησης της θερμοκρασίας. Κατά αυτόν τον τρόπο, βελτιώνεται η διείσδυση του διαλύτη στο εσωτερικό των κυττάρων και έτσι τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που λαμβάνουν χώρα αποκτούν μεγαλύτερο ρυθμό. [44], [46]



Εικόνα 6. Πειραματική διάταξη για εφαρμογή UAE [47]

4.2.3.2 Συνθήκες Λειτουργίας

Προκειμένου να αυξηθεί ο ρυθμός της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η συχνότητά της, μιας και η αύξηση της τιμής της, μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των υλικών. Καθοριστικής σημασίας είναι και η ίδια η φύση της πρώτης ύλης, η οποία μπορεί να εκχυλίζεται είτε νωπή είτε ξηρή και η οποία υπαγορεύει και την καταλληλότητα του διαλύτη. Ο διαλύτης θα πρέπει να επιλέγεται, επιπλέον, και με κριτήριο

το ιξώδες, την επιφανειακή τάση και την τάση ατμών του, μιας και αυτοί οι φυσικοχημικοί παράγοντες, επηρεάζουν το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Επιπλέον, θα πρέπει να ελέγχεται και η αύξηση της θερμοκρασίας, μιας και επιφέρει την αύξηση της τάσης ατμών και τη μείωση του ιξώδους, αποτελέσματα τα οποία επιδρούν στη διαφορά πίεσης, μειώνοντας την και παρεμποδίζοντας το φαινόμενο της σπηλαίωσης. [44]

4.2.3.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία είναι τα εξής:

- Μείωση του απαιτούμενου χρόνου εκχύλισης
- Μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων για την πραγματοποίησή της
- Μείωση της χρήσης διαλύτη
- Βελτιωμένη αναμιξιμότητα μεταξύ του διαλύτη και της προς εκχύλιση ουσίας
- Επιταχυνόμενα φαινόμενα μεταφοράς ενέργειας
- Μείωση των φαινομένων ποιοτικής υποβάθμισης της εκχυλιζόμενης ουσίας
- Δυνατότητα εκλεκτικής εκχύλισης [46]

Εκτός όμως από πλεονεκτήματα, η μέθοδος παρουσιάζει και μειονεκτήματα, που είναι τα ακόλουθα:

- Αδυναμία ανανέωσης του διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση σε συστήματα διαλείποντος έργου
- Η ανάγκη για εφαρμογή φιλτραρίσματος προκειμένου να παραληφθεί το εκχύλισμα, ενέχει τον κίνδυνο της παρουσίας απωλειών ή ακόμη και μόλυνσης κατά το χειρισμό μετά το πέρας της εκχύλισης [48]

4.2.4 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Ένζυμα

Οι εκχυλίσεις, που βασίζονται στη δράση των ενζύμων (EAE), κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος, ως μία λύση πιο φιλική προς το περιβάλλον, έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, που χρησιμοποιούν διαλύτες. Τα ένζυμα είναι σημαντικοί καταλύτες, που συμβάλλουν στην εκχύλιση, τροποποίηση ή σύνθεση συμπλεγμάτων βιοδραστικών συστατικών φυτικής προέλευσης. Σε εφαρμογές, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως είναι οι κυτταρινάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες, πολυγαλακτουρονάσες και ημικυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν με τέτοιο τρόπο, ώστε να επέλθει η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η εκχύλιση. Η προέλευσή τους ποικίλει και μπορεί να προέρχονται από βακτήρια, μύκητες ή εκχυλίσματα φρούτων και λαχανικών. [44], [49]

4.2.4.1 Αρχές και Μηχανισμοί Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Ένζυμα

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα βασίζεται στην ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν αντιδράσεις με μεγάλη εκλεκτικότητα και εξειδίκευση. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα είναι η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος, ώστε να απελευθερωθούν τα ενδοκυτταρικά συστατικά. Το κυτταρικό τοίχωμα, συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ύστερα από αλλαγή στο σχήμα του προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η επίδρασή του. Η αλλαγή στο σχήμα του, έχει ως αποτέλεσμα τη θραύση των δεσμών του κυτταρικού τοιχώματος και κατ' επέκταση την απελευθέρωση των συστατικών. [50]

4.2.4.2 Συνθήκες Λειτουργίας

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και είναι οι ακόλουθοι:

- pH: η ιδανική τιμή του pH για την πραγματοποίηση της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα, ποικίλει ανάλογα το ένζυμο. Για πολλά ένζυμα το βέλτιστο pH βρίσκεται κοντά στο εύρος του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών
- Θερμοκρασία: η θερμοκρασία θα πρέπει να ελέγχεται προκειμένου και να επιταχύνεται η διεργασία και να μην είναι πολύ αυξημένη, μιας και η αύξησή της, οδηγεί τόσο στην υποβάθμιση της ενεργότητας του ενζύμου, όσο και στην ποιοτική υποβάθμιση της πρωτεΐνης
- Χρόνος της εκχύλισης: η παράταση του χρόνου της εκχύλισης να μην έχει θετική επίδραση στη διαλυτοποίηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, όμως επιφέρει υποβάθμιση στο παραγόμενο εκχύλισμα και αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας
- Σύσταση-Συγκέντρωση ενζύμου: υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενζύμου, διευκολύνουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, όμως ενδεχομένως να προσδίδουν μια πικρή επίγευση στο εκχύλισμα, ενώ παράλληλα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν και το κόστος αγοράς του ενζύμου [50]

4.2.4.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα, είναι μια υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης και παρουσιάζει τα κάτωθι πλεονεκτήματα:

- Αυξημένη απόδοση στο προς εκχυλιζόμενο συστατικό και υψηλό βαθμό ανάκτησης
- Βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων της διεργασίας
- Ελάττωση των χρόνων εκχύλισης
- Μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις
- Μείωση αναγκαιότητας χρήσης διαλυτών

Παρά ταύτα η μέθοδος εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα που σχετίζονται κυρίως με το κόστος της. Πιο συγκεκριμένα:

- Η αγορά των ενζύμων είναι αρκετά ακριβή. Ως εκ τούτου, είναι περιορισμένες οι ποσότητες των πρώτων υλών που μπορούν να επεξεργαστούν και να εφαρμοστεί σε αυτά η ΕΑΕ
- Τα παρασκευάσματα των ενζύμων που είναι ήδη διαθέσιμα δεν μπορούν να υδρολύσουν εξ ολοκλήρου τα κυτταρικά τοιχώματα πολλών φυτικών ιστών και κατά αυτόν τον τρόπο ορισμένες φορές, η μέθοδος υστερεί στην επίτευξη μεγάλων αποδόσεων
- Η ΕΑΕ είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα, μιας και τα ένζυμα λειτουργούν κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες, όπως είναι η θερμοκρασία δράσης τους, το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών [49]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Προεπεξεργασία Εξαντλημένων Σπόρων Κριθαριού (BSG)

5.1.1 Ξήρανση Υπό Κατάψυξη - Λυοφιλίωση

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού BSG, όπου προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Αθηναϊκή Ζυθοποιία Α.Ε. Οι σπόροι τοποθετούνται σε πλαστικά δοχεία και φυλάσσονται σε καταψύκτη στους - 30°C.

5.1.1.1 Πειραματική διαδικασία

Για την ξήρανση υπό κατάψυξη της πρώτης ύλης, χρησιμοποιείται η διάταξη LEYBOLD-HERAEUS FREEZE-DRYER GT2. (Εικόνα 7) Η διάταξη περιλαμβάνει:

- Θάλαμο, που ψύχεται και εντός του οποίου επικρατούν συνθήκες μειωμένης πίεσης.
- Μεταλλικές πλάκες, πάνω στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα μέσα στο θάλαμο
- Αντλία λαδιού, που εξασφαλίζει τη μειωμένη πίεση εντός του θαλάμου



Εικόνα 7. Διάταξη ξήρανσης υπό κατάψυξη LEYBOLD-HERAEUS FREEZE-DRYER GT2

Η διαδικασία της ξήρανσης διαρκεί περίπου 48 ώρες. Η περιεχόμενη υγρασία των BSG υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της αρχικής και τελικής μάζας πριν και μετά τη διαδικασία ξήρανσης υπό κατάψυξη, όπως παρουσιάζεται στην Εξίσωση 1.

$$\%Υγρασία = \frac{w_{αρχ} - w_{τελ}}{w_{αρχ}} \text{ (Εξίσωση 1)}$$

Η ζύγιση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε ζυγό ακριβείας. Η περιεχόμενη υγρασία, υπολογίζεται ίση με 78,28 %

5.1.2 Άλεση BSG

Προκειμένου να ευνοηθεί η εκχύλιση των εξαντλημένων σπόρων κριθαριού, χρειάζεται να υποστούν λειοτρίβηση. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής της στερεής βιομάζας με το διαλύτη. Για την πραγματοποίηση της άλεσης των BSG, χρησιμοποιείται Grinder που προορίζεται για άλεση σπόρων καφέ.

5.1.3 Απολίπανση BSG

Για την ενίσχυση της απόδοσης της παραλαβής πρωτεϊνών από τα BSG, πραγματοποιείται προκατεργασία των σπόρων προς απομάκρυνση των λιπαρών. Αυτό επιτυγχάνεται με εκχύλιση των λιπαρών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το n-εξάνιο.

5.1.3.1 Πειραματική διαδικασία

Σε ζυγό ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany) ζυγίζονται 50 g αποξηραμένων BSG και ογκομετρούνται 250 mL n-εξανίου. Τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως και μεταφέρονται σε λουτρό πάγου, ενώ παράλληλα αναδεύονται με αναδευτήρα για διάστημα μίας ώρας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η απομόνωση των στερεών BSG από το διαλύτη μέσω φυγοκέντρησης για 20 λεπτά στις 3500xg σε δοχεία (falcon) των 50 mL με τη χρήση φυγοκέντρου (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY) (Εικόνα 11). Ύστερα, τα στερεά, δίχως πλέον λιπαρά BSG, τοποθετούνται σε φούρνο στους 42°C για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη, μέσω εξάτμισης, μέχρι να αποκτήσουν σταθερή μάζα. [51], [52]

Το ποσοστό των λιπαρών που περιέχονται στα BSG υπολογίζεται, ύστερα από ζύγιση της μάζας τους πριν και μετά την κατεργασία με n-εξάνιο, σε ζυγό ακριβείας. Ο υπολογισμός των λιπαρών γίνεται με βάση την Εξίσωση 2 και το περιεχόμενο ποσοστό των BSG σε λιπαρά υπολογίζεται ίσο με 8,33%

$$\% \text{Λιπαρά} = \frac{w_{\text{αρχ}} - w_{\text{τελ}}}{w_{\text{αρχ}}} \quad (\text{Εξίσωση 2})$$



Εικόνα 8. Πορεία προεπεξεργασίας BSG

5.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από BSG

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού είναι αναγκαία η διάρρηξη των κυττάρων τους, προκειμένου αυτές να απελευθερωθούν στο διαλύτη. Για την ανάκτηση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται η μέθοδος της εκχύλισης. Μελετώνται τρεις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης η συμβατική εκχύλιση, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους UAE και η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα EAE. Επιπλέον, εξετάζεται η επίδραση διαφορετικών παραγόντων στην απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών.

5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση

5.2.1.1 Υλικά-Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των συμβατικών εκχυλίσεων χρησιμοποιούνται εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού, που έχουν υποστεί απολίπανση. Ως διαλύτες επιλέγονται τα εξής αντιδραστήρια:

- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0,1 M
- Αιθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃CH₂OH-NaOH) σε αναλογία 45:55
- Μεθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃OH-NaOH) σε αναλογία 45:55

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν οι συμβατικές εκχυλίσεις είναι:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας 1000-5000 μ L
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρικές φιάλες
- Μαγνητικοί θερμαινόμενοι αναδευτήρες
- Κωνικές φιάλες με πώματα
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Θερμόμετρο
- Περιέκτες φυγοκέντρου (falcons) των 50 mL

5.2.1.2 Παράμετροι Συμβατικών Εκχυλίσεων

Κατά τις συμβατικές εκχυλίσεις μελετήθηκε η αναλογία στερεής βιομάζας και διαλύτη για δεδομένο χρόνο εκχύλισης και δεδομένη θερμοκρασία θέρμανσης. Πιο συγκεκριμένα, ως θερμοκρασία εκχύλισης, επιλέγεται αυτή των 50°C και ως χρόνος ανάδευσης εφαρμόζεται το χρονικό διάστημα των 2 ωρών. [51], [52] Οι αναλογίες της στερεής βιομάζας με το διαλύτη που αξιολογούνται είναι δύο και επιλέγονται οι αναλογίες 1:10 και 1:20.

5.2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Ως πρώτο βήμα για την έναρξη των εκχυλίσεων, παρασκευάζονται τα διαλύματα των διαλυτών. Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή του διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 0,1M, πραγματοποιείται αραιώση με απιονισμένο νερό πυκνού διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 10 M. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα της Ethanol/NaOH 1 M (45:55). Το διάλυμα αναδεύεται για μερικά λεπτά, ώστε να επέλθει η πλήρης ανάμειξη των διαλυτών. Κατά παρόμοιο τρόπο, παρασκευάζεται και το διάλυμα της μεθανόλης με το NaOH.

Στη συνέχεια, ζυγίζεται η ποσότητα των BSG που απαιτείται για την πραγματοποίηση κάθε πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε διαλύτη προστίθενται οι εξής ποσότητες:

- Αναλογία 1:10 : Ζυγίζονται 5 g BSG και ογκομετρούνται 50 mL διαλύτη
- Αναλογία 1:20 : Ζυγίζονται 2,5 g BSG και ογκομετρούνται 50 mL διαλύτη

Η στερεή βιομάζα αναδεύεται υπό θέρμανση στους 50°C για 2 ώρες με το διαλύτη και με το πέρας του διαστήματος αυτού, το σύστημα της εκχύλισης απομακρύνεται από το μαγνητικό αναδευτήρα και αποθηκεύεται σε falcons των 50 mL για περαιτέρω επεξεργασία. Τα πειράματα για κάθε παράμετρο (διαλύτης-αναλογία) επαναλαμβάνονται δύο φορές.

5.2.2 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους UAE

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους εφαρμόζεται προκειμένου να διαπιστωθούν τα οφέλη που μπορούν να προκύψουν ως προς την οικονομία χρόνου, την εξοικονόμηση ενέργειας, μιας και δε χρησιμοποιείται θέρμανση για την εκχύλιση των πρωτεϊνών, και της τελικής απόδοσης σε πρωτεΐνες.

5.2.2.1 Γλικά-Εξοπλισμός

Στη διενέργεια των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους χρησιμοποιούνται εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού BSG, που έχουν υποστεί απολίπανση. Ως διαλύτες επιλέγονται οι ίδιοι που χρησιμοποιούνται και στις συμβατικές εκχυλίσεις και είναι οι ακόλουθοι:

- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0,1 M
- Αιθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃CH₂OH-NaOH) σε αναλογία 45:55
- Μεθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃OH-NaOH) σε αναλογία 45:55

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την εφαρμογή της UAE είναι:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Θάλαμος υπερήχων - μικροκυμάτων (Ultrasonic Microwave Reaction System, Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) (Εικόνα 9)
- Μονάδα ψυκτικού υγρού
- Δοχείο εκχύλισης διπλού τοιχώματος (beaker)
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Περιέκτες φυγοκέντρου (falcons) των 50 mL

5.2.2.2 Παράμετροι Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Υπερήχους

Στις εκχυλίσεις που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια των υπερήχων η θερμοκρασία των πειραμάτων διατηρείται σταθερή και περίπου ίση με 25°C, με τη βοήθεια ψυκτικού μέσου, το οποίο ρέει εντός των τοιχωμάτων που περιβάλλουν το δοχείο της εκχύλισης, στο οποίο προστίθεται η βιομάζα και ο διαλύτης. Για τα αποτελέσματα της εκχύλισης μελετάται η επίδραση του συνδυασμού των εξής παραμέτρων, για κάθε έναν από τους διαλύτες που επιλέγονται.

- Αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη με επιλεγμένες αναλογίες αυτές των 1:10 και 1:20
- Ισχύς των υπερήχων με επιλεγμένες τιμές αυτές των 150, 450, 750 W
- Χρόνος της εκχύλισης με επιλεγμένες τιμές 5, 10, 20 λεπτά

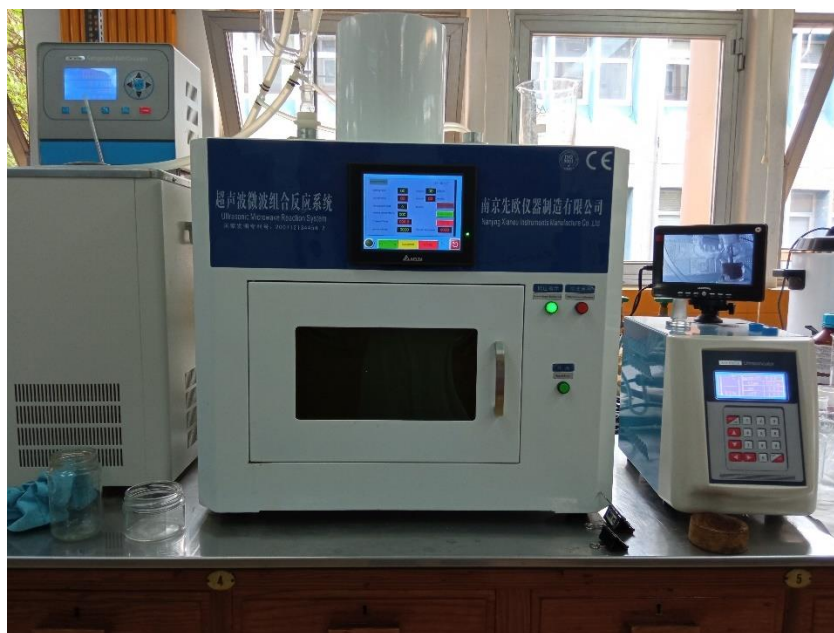
5.2.2.3 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, τίθεται σε λειτουργία το μηχάνημα που παρέχει το ψυκτικό υγρό και ρυθμίζεται η θερμοκρασία του ψυκτικού μέσου περίπου στους 12°C, ώστε να ελέγχεται σταθερή η θερμοκρασία της εκχύλισης στους 25°C, καθώς οι υπέρηχοι αυξάνουν απότομα και σε μεγάλο βαθμό τη θερμοκρασία. Μόλις η θερμοκρασία του ψυκτικού υγρού φτάσει στη θερμοκρασία που έχει ρυθμιστεί, ξεκινά η διαδικασία της εκχύλισης.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της UAE, ζυγίζεται η ποσότητα των BSG που απαιτείται για την πραγματοποίηση κάθε πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε διαλύτη και συνδυασμό ισχύος και χρόνου, προστίθενται οι εξής ποσότητες:

- Αναλογία 1:10 : Ζυγίζονται 5 g BSG και ογκομετρούνται 50 mL διαλύτη
- Αναλογία 1:20 : Ζυγίζονται 2,5 g BSG και ογκομετρούνται 50 mL διαλύτη

Στο δοχείο της εκχύλισης προστίθεται η ξηρή βιομάζα, ο διαλύτης και ο μαγνήτης ανάδευσης. Ταυτόχρονα, συνδέεται η παροχή εισόδου-εξόδου του ψυκτικού μέσου με το beaker και τίθεται σε εφαρμογή η ροή του. Η εκχύλιση πραγματοποιείται παρουσία ανάδευσης. Στη συνέχεια, καθορίζονται οι συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, δηλαδή η ισχύς των υπερήχων και ο χρόνος της εκχύλισης. Με την ολοκλήρωση του χρόνου της εκχύλισης, το περιεχόμενο της ξηρής βιομάζας που πλέον έχει υποστεί εκχύλιση, μαζί με το διαλύτη, μεταφέρονται σε περιέκτη (falcon) των 50 mL, για περαιτέρω επεξεργασία. [53] Τα πειράματα για κάθε παράμετρο (διαλύτης, αναλογία, ισχύς, χρόνος εκχύλισης), επαναλαμβάνονται δύο φορές.



Εικόνα 9. Θάλαμος Υπερήχων-Μικροκυμάτων (Ultrasonic Microwave Reaction System)

5.2.3 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Ένζυμα ΕΑΕ

5.2.3.1 Γλικά-Εξοπλισμός

Στη διενέργεια των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με ένζυμα χρησιμοποιούνται εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού BSG, που έχουν υποστεί απολίπανση. Ως διαλύτης, σε αυτόν τον τύπο εκχύλισης, χρησιμοποιείται αλατούχο διάλυμα με φωσφορικά (phosphate buffer) pH 7, στο οποίο προστίθεται το ένζυμο Alcalase 2.4 L [54] (Εικόνα 10).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, απαιτείται ο εξής εξοπλισμός:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Θάλαμος υπερήχων - μικροκυμάτων (Ultrasonic Microwave Reaction System, Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) (Εικόνα 9)
- Μονάδα ψυκτικού υγρού
- Δοχείο εκχύλισης διπλού τοιχώματος (beaker)
- Ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας 100-1000 μ L
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρικές φιάλες
- Μαγνητικοί θερμαινόμενοι αναδευτήρες
- Κωνικές φιάλες με πώματα
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Θερμόμετρο
- Περιέκτες φυγοκέντρου (falcons) των 50 mL

5.2.3.2 Παράμετροι Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Ένζυμο

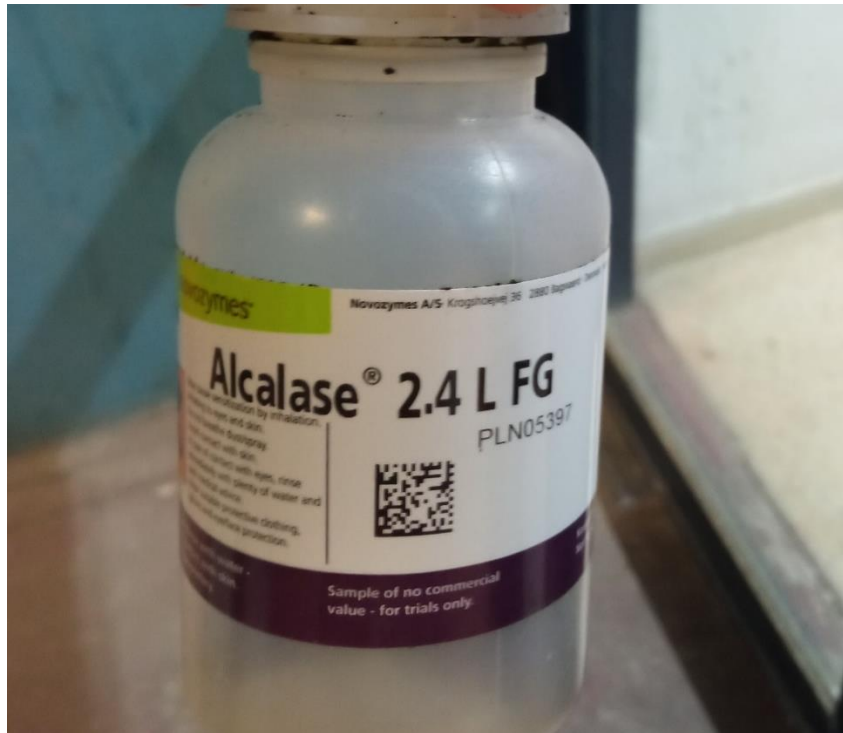
Για την εφαρμογή της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμο, διατηρείται σταθερή η αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη και επιλέγεται η αναλογία 1:20, καθώς επίσης και η θερμοκρασία της εκχύλισης στους 50°C, θερμοκρασία στην οποία λειτουργεί σε άριστο βαθμό το ένζυμο. [55] Επιπλέον, μελετώνται οι παράμετροι του χρόνου, της αναλογίας του ενζύμου καθώς επίσης και η χρήση BSG που έχουν υποστεί προεπεξεργασία με τη χρήση υπερήχων και BSG που δεν έχουν κατεργαστεί προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα, επιλέγονται οι εξής παράμετροι:

- Αναλογία ενζύμου: 10 mg και 20 mg
- Χρόνος εκχύλισης: 6, 12 και 24 ώρες

5.2.3.3 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται η κατεργασία των BSG με τη χρήση υπερήχων. Για το σκοπό αυτό, ζυγίζονται 2,5 g BSG και ογκομετρούνται 50 mL απιονισμένου νερού. Η ξηρή βιομάζα, ο διαλύτης και ο μαγνήτης ανάδευσης προστίθενται στο δοχείο εκχύλισης διπλού τοιχώματος (beaker). Η κατεργασία των BSG με τη χρήση υπερήχων, πραγματοποιείται για 10 λεπτά σε ισχύ υπερήχων 450 W. Ύστερα, η εκχυλισμένη πλέον βιομάζα μαζί με το διαλύτη μεταφέρονται σε περιέκτες και οδηγούνται σε φυγοκέντρηση προκειμένου να απομονωθούν οι BSG που έχουν υποστεί διάρρηξη. Προκειμένου να απομακρυνθεί ο διαλύτης που εισχωρεί στη βιομάζα, αυτή αποθηκεύεται σε φούρνο στους 42°C μέχρι την πλήρη απομάκρυνσή του.

Στη συνέχεια, ζυγίζεται 1 g BSG κατεργασμένο με χρήση υπερήχων ή μη, και προστίθεται σε κωνική φιάλη μαζί με τον όγκο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για κάθε πείραμα. Το σύνολο του διαλύτη και της βιομάζας, τίθενται υπό ανάδευση για διάστημα 6, 12 και 24 ωρών στους 50°C. Με το πέρας των εκάστοτε χρονικών διαστημάτων, το σύστημα της εκχύλισης μεταφέρεται σε falcons των 50 mL, για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 10. Alcalase 2.4 L

Για την ποσότητα της αλκαλάσης των 10 mg και των 20 mg, ογκομετρούνται 290 μL και 580 mL, αντίστοιχα. Σε αυτά, προστίθενται 19,71 mL και 19,42 mL phosphate buffer, αντίστοιχα. Παράγεται, δηλαδή διάλυμα buffer-αλκαλάσης 20 mL και στις δύο περιπτώσεις ώστε να τηρηθεί η αναλογία στερεού υγρού 1:20.

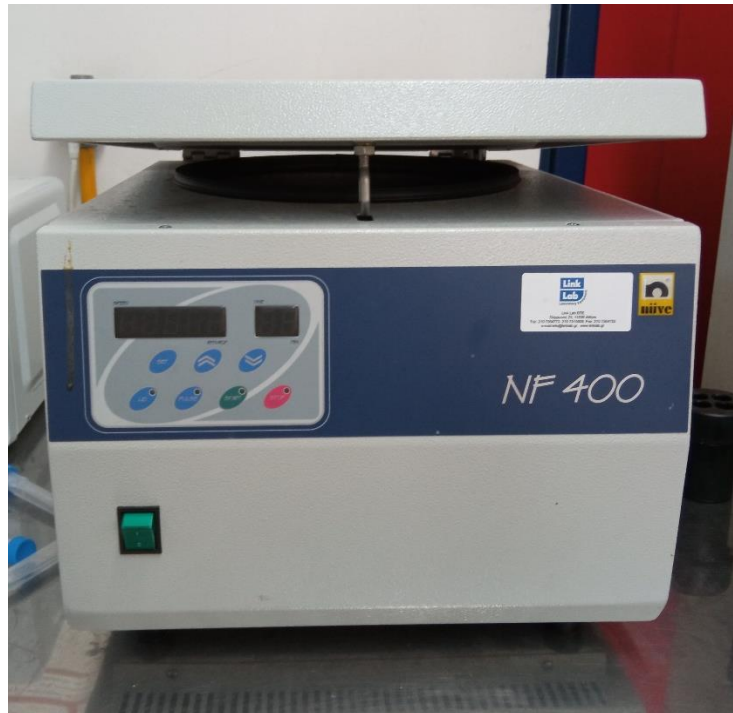
Επιπλέον, παράγεται και ένα σύστημα buffer-αλκαλάσης, με συγκέντρωση αλκαλάσης τα 20 mg, το οποίο οδηγείται σε κατάσταση βρασμού για περίπου 20 λεπτά, προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Στη συνέχεια, αυτό προστίθεται σε 1 g BSG και αφήνεται σε κατάσταση ανάδευσης στους 50°C για 24 ώρες. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται ως τυφλό πείραμα στη μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου.

5.3 Παραλαβή ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από συμβατικές εκχυλίσσεις και εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους UAE

Σε αυτά τα στάδια, λαμβάνουν χώρα διεργασίες που έχουν ως στόχο την παραλαβή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε στερεή ξηρή μορφή με απώτερο σκοπό τη μέτρηση του περιεχομένου τους.

5.3.1 Φυγοκέντρηση

Τα συστήματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσσεις, δηλαδή η βιομάζα που έχει υποστεί εκχύλιση (συμβατική, UAE) μαζί με το διαλύτη, αφού μεταφερθούν σε περιέκτες (falcons) των 50 mL, διαχωρίζονται, προκειμένου να απομονωθεί το εκχύλισμα. Για την απομόνωση του εκχυλίσματος εφαρμόζεται η μέθοδος της φυγοκέντρησης, μέσω της διάταξης φυγοκέντρου (Centrifuge NF400, Nune, ANKARA/TURKEY) που φαίνεται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Διάταξη φυγοκέντρου (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)

Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός της υγρής από τη στερεή φάση, πραγματοποιείται ύστερα από φυγοκέντρωση στις 3500xg στροφές για 20 λεπτά. Η υγρή φάση που απομονώνεται, μεταφέρεται, επίσης, σε falcons των 50 mL και αποθηκεύεται για περαιτέρω επεξεργασία. Το στερεό τμήμα, δηλαδή τα κατεργασμένα BSG, απορρίπτονται.

5.3.2 Καταβύθιση πρωτεϊνών

Η καταβύθιση των πρωτεϊνών βασίζεται στη μέθοδο του ισοηλεκτρικού σημείου. Το pH του εκχυλίσματος, στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες, ρυθμίζεται σε τέτοια τιμή ώστε τα μόρια των πρωτεϊνών να είναι ηλεκτρικά ουδέτερα. Το σημείο εκείνο, που συμβαίνει αυτή η αλλαγή, είναι το ισοηλεκτρικό σημείο. Κατά αυτό το στάδιο, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μικρή διαλυτότητα και για αυτό το λόγο δημιουργούν συσσωματώματα, καταβυθίζονται και διατηρούν στερεή δομή. Έτσι, λοιπόν, στο διάλυμα παρουσιάζεται εμφανής θολότητα χάρη σε αυτήν την καταβύθιση. [11]

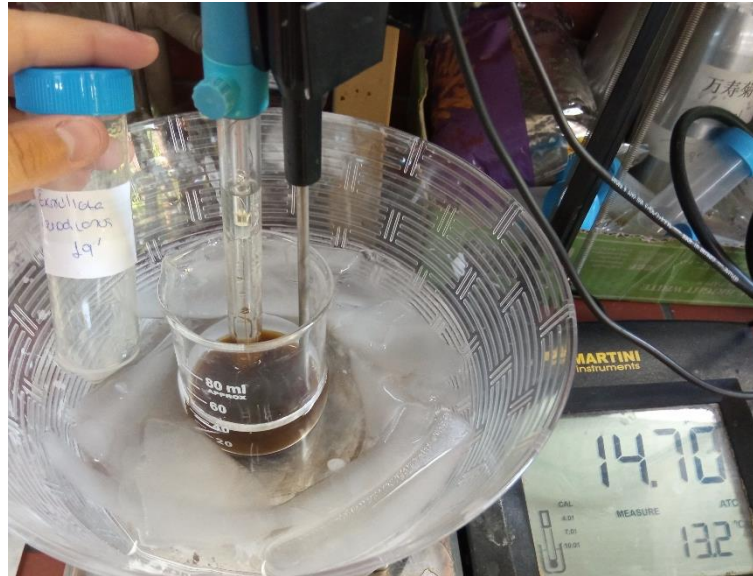
5.3.2.1 Υλικά-Εξοπλισμός

Για την καταβύθιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια πυκνό υδροχλωρικό οξύ και ο αντίστοιχος εξοπλισμός είναι ο ακόλουθος:

- Πεχάμετρο (Multiparameter Bench, Mi 180, MARTINI instruments)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ποτήρια ζέσεως
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Φυγόκεντρος (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)
- Περιέκτες (falcons) 50 mL

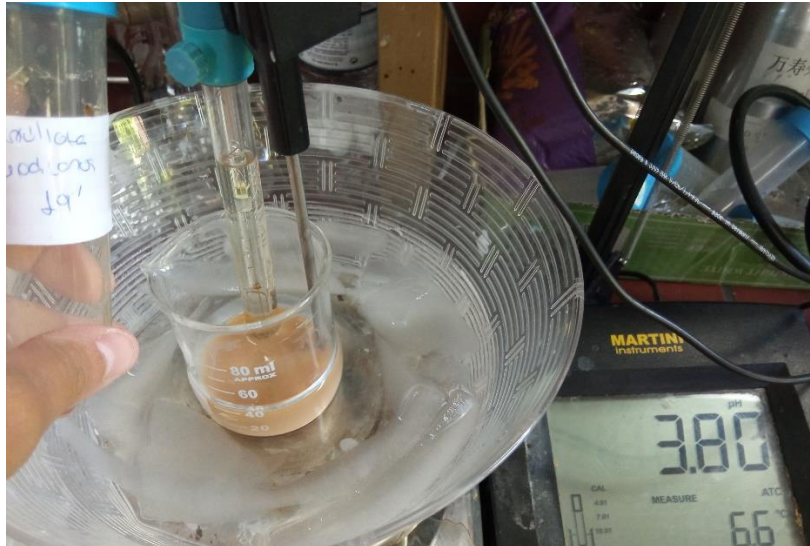
5.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Το εκχύλισμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται μαγνήτης ανάδευσης. Το ποτήρι μεταφέρεται σε μαγνητικό αναδευτήρα και μέσα σε αυτό εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο του pH και το θερμοστοιχείο. Το pH του εκχυλίσματος πρέπει να ρυθμιστεί στο 3,8 που είναι η τιμή που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες με προέλευση τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού.



Εικόνα 12. Εκχύλισμα πρωτεϊνών προερχόμενων από τα BSG πριν την καταβύθιση

Η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται σε λουτρό πάγου, προκειμένου να ευνοηθεί η κρυστάλλωση των καταβυθισμένων πρωτεϊνών και η θερμοκρασία του εν λόγω διαλύματος να φτάσει περίπου του 4°C. Η ρύθμιση του pH γίνεται με σταδιακή προσθήκη πυκνού υδροχλωρικού οξέος. [53] Το διάλυμα, του οποίου η τιμή του pH ρυθμίζεται, ταυτόχρονα αναδεύεται. Μόλις επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή, αναμένεται η σταθεροποίηση της, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13. Στη συνέχεια, το διάλυμα του οποίου η τιμή του pH ρυθμίζεται, μεταφέρεται σε περιέκτες των 50mL και οδηγείται για φυγοκέντρηση. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται για 20 λεπτά στις 3500xg στροφές. Από το προϊόν της φυγοκέντρησης απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα και διατηρείται το στερεό ίζημα, στο οποίο είναι καταβυθισμένες οι πρωτεΐνες. Το στερεό υπόλειμμα φυλάσσεται σε falcons των 50 mL μέχρι τη διαδικασία της επαναδιάλυσής του.



Εικόνα 13. Ρυθμισμένη τιμή pH εκχυλίσματος στο ισοηλεκτρικό σημείο

5.3.3 Επαναδιάλυση καταβυθισμένου στερεού υπολείμματος

Οι πρωτεΐνες, που έχουν καταβυθιστεί στο προηγούμενο στάδιο και αποτελούν το στερεό υπόλειμμα της φυγοκέντρησης, χρειάζεται να υποστούν μια διεργασία επαναδιάλυσης, προκειμένου να επανέλθουν σε υγρή μορφή διαλυμένη στο νερό. Αυτό πραγματοποιείται με ρύθμιση του pH στη τιμή 7. [53]

5.3.3.1 Υλικά-Εξοπλισμός

Στην επαναδιάλυση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται ως διαλύτης απιονισμένο νερό και επιπλέον πραγματοποιείται η ρύθμιση του pH με τη χρήση διαλύματος NaOH 0,1 M.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την επαναδιάλυση του στερεού υπολείμματος:

- Συσκευή Vortex
- Πεχάμετρο (Multiparameter Bench, Mi 180, MARTINI instruments)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ποτήρια ζέσεως
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Περιέκτες (falcons) 50 mL

5.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, στο στερεό υπόλειμμα, που είναι αποθηκευμένο στο falcon, προστίθεται απιονισμένο νερό ποσότητας περίπου 20 mL. Το περιεχόμενο του falcon αναδεύεται με μεγάλη ταχύτητα σε συσκευή Vortex, έως ότου να μην παρατηρούνται πλέον συσσωματώματα. Προκειμένου να γίνει περαιτέρω επαναδιάλυση, προστίθεται όσο ακόμα απιονισμένο νερό χρειάζεται για να διαλυθούν πλήρως τα συσσωματώματα. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του falcon μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται μαγνήτης ανάδευσης. Έπειτα, ρυθμίζεται το pH του επαναδιαλυμένου στερεού υπολείμματος στην τιμή 7, στην οποία επαναδιαλυτοποιούνται οι πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό, προστίθεται στάγδην διάλυμα Υδροξειδίου του Νατρίου (NaOH), μέχρι να επέλθει η επιθυμητή τιμή.

Τέλος, το διάλυμα μεταφέρεται σε falcons των 50 mL και διατηρείται στην κατάψυξη στους - 30°C, προκειμένου στη συνέχεια να εφαρμοστεί η διαδικασία της ξήρανσης υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση), στη διάταξη EYBOLD–HERAEUS FREEZE–DRYER GT2 όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 5.1. Με το πέρας περίπου 72 ωρών, έχει ολοκληρωθεί η λυοφιλίωση και παραλαμβάνεται το ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 παρακάτω.



Εικόνα 14. Ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από BSG

5.4 Μέτρηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου

Προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών, εφαρμόζεται η μέθοδος μέτρησης Bradford. Ως αντιδραστήριο για την εκτέλεση της μεθόδου, χρησιμοποιείται η χρωστική BrilliantBlueG, διαλυμένη σε φωσφορικό οξύ και μεθανόλη ή αιθανόλη. Η χρωστική αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών και δίνει μέγιστες απορροφήσεις στα 465-595 nm. Η συγκέντρωση των περιεχόμενων πρωτεϊνών εκφράζεται ως αναλογία της απορρόφησης. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητη η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης για τη μέτρηση των πρωτεϊνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της αλβουμίνης ως πρότυπης πρωτεΐνης. [56]

5.4.1 Παρασκευή Διαλύματος Χρωστικής BrilliantBlueG

5.4.1.1 Υλικά-Εξοπλισμός

Για την παρασκευή του διαλύματος, χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια:

- Σκόνη BrilliantBlueG
- Αιθανόλη
- Buffer φωσφορικού οξέος
- Απιονισμένο νερό

Ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι ο ακόλουθος:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρι ζέσεως
- Χωνί διήθησης
- Φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy)
(Εικόνα 16)

5.4.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ζυγίζονται 50 mg της χρωστικής BrilliantBlueG, τα οποία διαλύονται σε 25 mL αιθανόλης. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθενται 500 mL φωσφορικού οξέος 85% και αναδύονται ήπια, μέχρι να επιτευχθεί ομογενοποίηση του διαλύματος. Ύστερα, πραγματοποιείται αραιώση του διαλύματος που προκύπτει με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Καταληκτικά, το διάλυμα περνά από διηθητικό χαρτί μέσω διηθητικού χωνιού (Εικόνα 15), προκειμένου να κατακρατηθεί τυχόν στερεό υπόλειμμα της χρωστικής που δεν έχει διαλυθεί. Το διηθημένο διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο και περιτυλίσσεται, προκειμένου να αποφευχθεί η οποιαδήποτε επίδραση του με το φως και φυλάσσεται στο ψυγείο.



Εικόνα 15. Διήθηση διαλύματος BrilliantBlueG

5.4.1.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford

Ύστερα από την παρασκευή του διαλύματος Bradford, γίνονται μετρήσεις, προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη μέτρησης. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιούνται αραιωμένα διαλύματα αλβουμίνης, γνωστών συγκεντρώσεων, και μετράται η εκάστοτε απορρόφηση. Οι μετρήσεις των διαλυμάτων γίνονται σε φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy), σε μήκος κύματος 595 nm και ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται νερό. Για τη μέθοδο προστίθενται 0,1 mL του προς εξέταση διαλύματος και 3 mL του διαλύματος Bradford. Παρατηρείται η αλλαγή στο χρωματισμό της χρωστικής και γίνεται

εμφανές το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, ένδειξη ύπαρξης πρωτεϊνών στο διάλυμα. Το διάλυμα που προκύπτει ανακινείται σε συσκευή Vortex και αναμένεται το πέρας 15 λεπτών, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Τότε, το διάλυμα μεταφέρεται σε κυψελίδα και λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης.



Εικόνα 16. Φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy)

5.4.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα ξηρά εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων και των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους

5.4.2.1 Γλικά-Εξοπλισμός

Τα ξηρά εκχυλίσματα που προκύπτουν ύστερα από τη λυοφιλίωση, κατεργάζονται με τον εκάστοτε διαλύτη, ο οποίος χρησιμοποιείται στη διενέργεια της εκχύλισης, προκειμένου αυτά να επαναδιαλυθούν και να εφαρμοστεί η μέθοδος της μέτρησης Bradford.

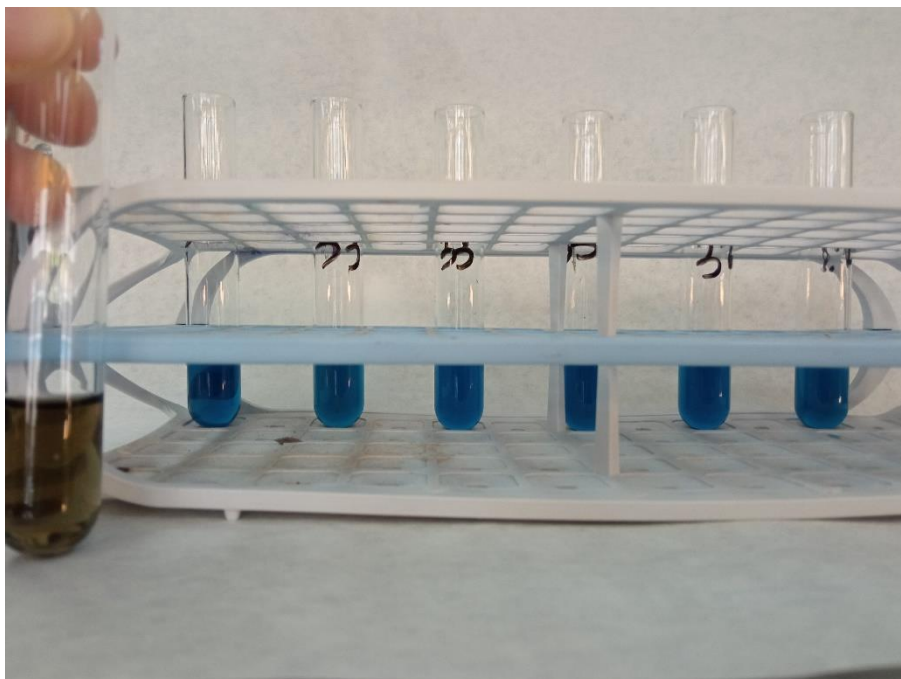
Τα σκεύη και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούνται προκειμένου να μετρηθεί το φορτίο των πρωτεϊνών, που έχουν εκχυλιστεί, είναι τα ακόλουθα:

- Ζυγός Ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Φυγόκεντρος (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)
- Συσκευή Vortex
- Ηλεκτρονική πιπέτα 10-100 μ L
- Ηλεκτρονική πιπέτα 1000-5000 mL
- Φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy)

5.4.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ζυγίζονται 50 mg ξηρού εκχυλίσματος σε ζυγό ακριβείας και στη συνέχεια ογκομετρώνται 10 mL του εκάστοτε διαλύτη. Η ζυγισμένη ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος μαζί με το διαλύτη

προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως και αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 30-40 λεπτά. Το διάλυμα που προκύπτει στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο για 5 λεπτά στις 3000×g, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα στερεά τμήματα του ξηρού εκχυλίσματος στον εκάστοτε διαλύτη. Από το υπερκείμενο διάλυμα, που προέρχεται από τη φυγοκέντρηση, λαμβάνονται με ηλεκτρονική πιπέτα 100 μL και μεταφέρονται στο δοκιμαστικό σωλήνα. Εκεί, προστίθενται και 3 mL του διαλύματος Bradford. Παρατηρείται η χαρακτηριστική αλλαγή του χρώματος του διαλύματος και η κυριαρχία του μπλε (όπως φαίνεται στην εικόνα 17) και το διάλυμα υφίσταται γρήγορη ανάδευση σε συσκευή Vortex. Ύστερα από αναμονή 15 λεπτών, το διάλυμα μεταφέρεται σε κυψελίδα και φωτομετρείται στο φωτόμετρο UV-Vis Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-M51, BEL Engineering, Italy) στα 595 nm. Καταγράφεται η ένδειξη της απορρόφησης και μέσω της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται ο κάθε διαλύτης για τις αντίστοιχες μετρήσεις των εκχυλισμάτων.



Εικόνα 17. Αλλαγή χρώματος δειγμάτων ύστερα από την προσθήκη του διαλύματος Bradford

5.4.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με ένζυμα

Η μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υγρά εκχυλίσματα, που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενης με ένζυμα, πραγματοποιείται κατά ανάλογο τρόπο με αυτόν που περιγράφεται παραπάνω. Σε αυτήν την περίπτωση, όμως, λαμβάνεται δείγμα απευθείας από το υγρό εκχύλισμα, δηλαδή την υπερκείμενη φάση που προκύπτει από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης, ύστερα από την εκχύλιση. Πιο συγκεκριμένα, με πιπέτα ακριβείας λαμβάνονται 100 μL δείγματος και μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο προστίθενται 3 mL διαλύματος Bradford. Το δείγμα, που έχει αποκτήσει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, αναδεύεται σε συσκευή Vortex και ύστερα από 15 λεπτά φωτομετρείται στο φωτόμετρο UV-Vis και καταγράφεται η απορρόφηση. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται το δείγμα που έχει προκύψει ύστερα από την κατεργασία με την απενεργοποιημένη αλκαλάση.

5.5 Προεπεξεργασία υπολειμμάτων εξαντλημένης μαγιάς BSY

Η πρώτη ύλη των υπολειμμάτων της εξαντλημένης μαγιάς, παραχωρείται από την εταιρεία Αθηναϊκή Ζυθοποιία Α.Ε. Παραλαμβάνονται δείγματα αυτολυμένης μαγιάς τα οποία αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους - 30°C μέχρι την επεξεργασία και χρήση τους.

5.5.1 Απομάκρυνση υπολειμμάτων μύρας

Στη διαδικασία απομόνωσης των κυττάρων των υπολειμμάτων μαγιάς και τον καθαρισμό τους από την παρουσία μύρας, χρησιμοποιείται αλατούχο διάλυμα με φωσφορικά (phosphate buffer) pH 7.

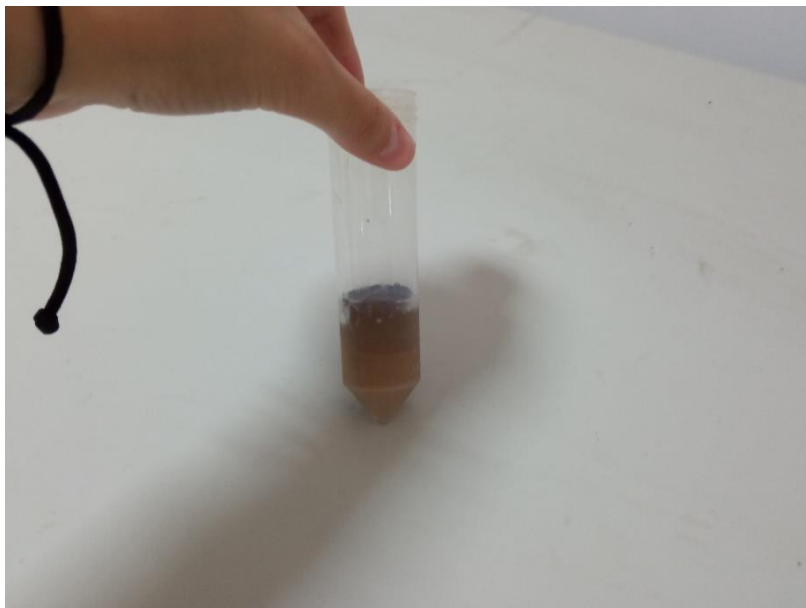
5.5.1.1 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση αυτής της διαδικασίας είναι ο ακόλουθος:

- Φυγόκεντρος (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)
- Συσκευή Vortex

5.5.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, η πρώτη ύλη των υπολειμμάτων μαγιάς, φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 3500×g στροφές, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η υγρή φάση της. Στη συνέχεια, το στερεό υπόλειμμα, δηλαδή τα κύτταρα της μαγιάς υφίστανται έκπλυση με αλατούχο διάλυμα με φωσφορικά (phosphate buffer) pH 7. Το στερεό υπόλειμμα μαζί με το buffer αναδεύονται ταχέως σε συσκευή Vortex και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες (3500×g, 20λεπτά). Το στερεό καταβύθισμα υφίσταται τη διαδικασία της έκπλυσης συνολικά τρεις φορές, προκειμένου να απομακρυνθούν τα περιεχόμενα της μύρας όπως έχουν προκύψει από το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. [57] Τα κύτταρα της μαγιάς, που έχουν υποστεί τη διαδικασία της απομάκρυνσης της μύρας, αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους - 30°C, για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 18. Κύτταρα υπολειμμάτων μαγιάς

5.5.2 Υπολογισμός περιεχόμενης υγρασίας στα κύτταρα της μαγιάς

Για τη διενέργεια των πειραμάτων με τη χρήση των υπολειμμάτων της μαγιάς, χρησιμοποιούνται νωπά κύτταρα που έχουν προκύψει από την προηγούμενη διαδικασία. Εξαιτίας της χρήσης των νωπών κυττάρων της μαγιάς, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός της περιεχόμενης υγρασίας της, προκειμένου να υπολογιστεί ο όγκος του διαλύτη με τον οποίο θα κατεργαστεί, ώστε να αντιστοιχεί σε ξηρό βάρος.

Για το σκοπό αυτό ορισμένη ποσότητα νωπής μαγιάς, ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 100°C για χρονικό διάστημα 2 ωρών. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το δείγμα ζυγίζεται και η διαφορά μάζας που προκύπτει, αντιστοιχεί στο ποσό της υγρασίας που εξατμίστηκε κατά την κατεργασία με θέρμανση. Ο υπολογισμός της περιεχόμενης υγρασίας πραγματοποιείται μέσω της εξίσωσης 1. Η περιεχόμενη υγρασία στα κύτταρα των υπολειμμάτων μαγιάς αντιστοιχεί σε 69,05%.

5.5.3 Εκχυλίσαις πρωτεϊνών από υπολείμματα εξαντλημένης μαγιάς BSY

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς είναι αναγκαία η διάρρηξη των κυττάρων της, ώστε αυτές να απελευθερωθούν στο διαλύτη. Ομοίως, όπως και για την απομόνωση πρωτεϊνών από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού, χρησιμοποιείται ως μέθοδος διάρρηξης η εκχύλιση. Μελετώνται δύο διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, η συμβατική εκχύλιση και η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους UAE. Στην παρούσα μέθοδο, μελετήθηκε η χρήση των ίδιων διαλυτών που χρησιμοποιούνται και στις εκχυλίσαις πρωτεϊνών από BSY, αλλά και η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (phosphate buffer) pH 7. [57] Τέλος εφαρμόζονται οι καλύτερες συνθήκες που προέκυψαν από την εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το υδροξείδιο του Νατρίου NaOH 0,1 M.

5.5.3.1 Υλικά-Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων χρησιμοποιούνται νωπά κύτταρα εξαντλημένης μαγιάς, από τα οποία έχει απομακρυνθεί η υγρή φάση της μύρας. Ως διαλύτες επιλέγονται τα εξής αντιδραστήρια:

- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0,1 M
- Αιθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃CH₂OH-NaOH) σε αναλογία 45:55
- Μεθανόλη-Υδροξείδιο του Νατρίου 1 M (CH₃OH-NaOH) σε αναλογία 45:55
- Αλατούχο διάλυμα με φωσφορικά (phosphate buffer) pH 7

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν οι συμβατικές εκχυλίσαις είναι:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας 1000-5000 μ L
- Μαγνητικοί θερμαινόμενοι αναδευτήρες
- Κωνικές φιάλες με πώματα
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Θερμόμετρο
- Περιέκτες φυγοκέντρου (falcons) των 50 mL

- Θάλαμος υπερήχων - μικροκυμάτων (Ultrasonic Microwave Reaction System, Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) (Εικόνα 9)
- Μονάδα ψυκτικού υγρού
- Δοχείο εκχύλισης διπλού τοιχώματος (beaker)
- Φυγόκεντρος (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)

5.5.3.2 Συμβατική εκχύλιση πρωτεϊνών από BSY-Πειραματική διαδικασία

Κατά τη συμβατική εκχύλιση των πρωτεϊνών από τα υπολείμματα της μαγιάς, διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία της εκχύλισης στους 50°C και ο χρόνος της εκχύλισης ορίζεται να είναι οι 24 ώρες. [55] Αρχικά ζυγίζεται ποσότητα ίση με περίπου 2 g νωπής BSY και ογκομετρούνται περίπου 12 mL διαλύτη που αντιστοιχούν στο ξηρό βάρος της μαγιάς. Η στερεή βιομάζα αναδεύεται υπό θέρμανση στους 50°C για 24 ώρες με το διαλύτη και με το πέρας του διαστήματος αυτού, το σύστημα της εκχύλισης απομακρύνεται από το μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια υφίσταται φυγοκέντρηση και λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα που αποτελεί το εκχύλισμα της BSY και φυλάσσεται σε falcons των 50 mL για περαιτέρω επεξεργασία.

5.5.3.3 Εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη με υπερήχους από BSY

Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια υπερήχων, αρχικά, ζυγίζονται περίπου 3 g BSY και ογκομετρούνται περίπου 30 mL διαλύτη. Η ξηρή βιομάζα, ο διαλύτης και ο μαγνήτης ανάδευσης προστίθενται στο δοχείο εκχύλισης διπλού τοιχώματος (beaker). Ακολουθεί η διαδικασία λειτουργίας του θαλάμου υπερήχων, όπως περιγράφεται παραπάνω. Η κατεργασία της BSY με τη χρήση υπερήχων, πραγματοποιείται για 20 λεπτά σε ισχύ υπερήχων 750 W. Ύστερα, η εκχυλισμένη πλέον βιομάζα μαζί με το διαλύτη μεταφέρονται σε περιέκτες και οδηγούνται σε φυγοκέντρηση προκειμένου να απομονωθεί το εκχύλισμα και να αποθηκευτεί για περαιτέρω επεξεργασία.

5.5.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων της BSY

Η μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υγρά εκχυλίσματα, που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενης με ένζυμα, πραγματοποιείται κατά ανάλογο τρόπο με αυτόν που περιγράφεται παραπάνω. Σε αυτήν την περίπτωση, όμως, λαμβάνεται δείγμα απευθείας από το υγρό εκχύλισμα, δηλαδή την υπερκείμενη φάση που προκύπτει από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης, ύστερα από την εκχύλιση. Αρχικά, ογκομετρούνται 100 μ L δείγματος και μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο προστίθενται 3 mL διαλύματος Bradford. Το δείγμα, που έχει αποκτήσει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, αναδεύεται σε συσκευή Vortex και ύστερα από 15 λεπτά φωτομετρείται στο φωτόμετρο UV-Vis και καταγράφεται η απορρόφηση. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται κάθε φορά ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση.

5.6 Αναλύσεις Λειτουργικών Ιδιοτήτων Ξηρών Πρωτεϊνικών Εκχυλισμάτων

Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιούνται προκειμένου να προκύψει ο ποιοτικός χαρακτηρισμός της σκόνης πρωτεΐνης που παραλαμβάνεται από τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για τα BSG. Επιπλέον μέσω των αναλύσεων αυτών καταδεικνύεται η επίδραση της τεχνολογίας των υπερήχων. Οι αναλύσεις που πραγματοποιούνται είναι η κατανομή μεγέθους σωματιδίων και η ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου.

5.6.1 Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution)

Η μέτρηση της κατανομής μεγέθους σωματιδίων πραγματοποιείται προκειμένου να δώσει αποτελέσματα σχετικά με τη διάμετρο των κόκκων σκόνης καθώς επίσης και της κατανομής του συνόλου του μεγέθους των σωματιδίων.

5.6.1.1 Υλικά – Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μέτρησης χρησιμοποιείται ως διαλύτης το οξικό οξύ και επιλέγεται εξαιτίας της μη ικανότητάς του να διαλυτοποιεί τις σκόνες των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στη διενέργεια των συγκεκριμένων μετρήσεων, είναι ο ακόλουθος:

- Αναλυτής κατανομής μεγέθους σωματιδίων με χρήση φωτός μέτρησης επιπέδων μm (Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer) (Εικόνα 19)
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής
- Λογισμικό Microtrac FLEX



Εικόνα 19. Αναλυτής κατανομής μεγέθους σωματιδίων (Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer)

5.6.1.2 Πειραματική Διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης ο υποδοχέας γεμίζεται με οξικό οξύ και τίθεται σε λειτουργία η ροή του διαλύτη εντός του οργάνου που πραγματοποιεί τη μέτρηση μέσω της χρήσης λέιζερ. Στη συνέχεια μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή τίθεται το μηχάνημα σε λειτουργία προκειμένου να ληφθεί μέτρηση control για το διαλύτη δίχως την παρουσία σκόνης. Κατόπιν προστίθεται στον υποδοχέα ελάχιστη ποσότητα σκόνης σύμφωνα με την ένδειξη του ηλεκτρονικού υπολογιστή που προειδοποιεί για την ικανή ποσότητα σκόνης ώστε να ληφθεί η μέτρηση και διασπείρεται μέσω του οξικού οξέος στις σωληνώσεις του οργάνου. Το όργανο πραγματοποιεί τρεις μετρήσεις και ύστερα από τις επαναλήψεις λαμβάνεται το αποτέλεσμα των μετρήσεων από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η μέτρηση που μελετάται είναι εκείνη της μέσης διαμέτρου ανά όγκο σωματιδίων και λαμβάνεται σε μm.

5.6.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού και Ελαίου (Water and Oil Absorption Capacity)

Στην παρούσα ανάλυση μελετάται η ικανότητα της σκόνης να προσλαμβάνει νερό και έλαιο ύστερα από ανάμειξη με κάθε ένα από τα δύο μέσα.

5.6.2.1 Υλικά – Εξοπλισμός

Για τις μετρήσεις συγκράτησης χρησιμοποιούνται απιονισμένο νερό και ηλιέλαιο.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα ανάλυση είναι ο ακόλουθος

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας 100-1000 µL
- Περιέκτες φυγοκέντρου (falcons) των 15 mL
- Συσκευή Vortex
- Φυγόκεντρος (Centrifuge NF400, Nuve, ANKARA/TURKEY)

5.6.2.2 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά ζυγίζονται 100 mg σκόνης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και σε αυτά προστίθεται 1 mL είτε νερού είτε ελαίου. Το δείγμα μαζί με το μέσο μεταφέρονται σε περιέκτες φυγοκέντρου και ανακινούνται έντονα σε συσκευή Vortex για 10 s και διατηρούνται σε κατάσταση ηρεμίας για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται σε διάταξη φυγοκέντρου για 20 λεπτά στις 3500xg στροφές. Το υπερκείμενο συλλέγεται προσεκτικά προκειμένου να ζυγιστεί. Η ικανότητα συγκράτησης νερού/ελαίου ποσοτικοποιείται ως η διαφορά μάζας του νερού/ελαίου πριν και μετά την κατεργασία ως προς το βάρος της σκόνης που χρησιμοποιείται στη μέτρηση. [53]

5.7 Κωδικοποίηση Παραμέτρων Πειράματος

Στον Πίνακα 3 αναλύονται οι κωδικοί που χαρακτηρίζουν τις μεθόδους και τις παραμέτρους που μελετούνται στην πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 3. Κωδικοποίηση μεθόδων και παραμέτρων

Μέθοδος	Κωδικός	Διαλύτης	Κωδικός	Αναλογία Στερεής Βιομάζας-Διαλύτη	Κωδικός
Συμβατική Εκχύλιση	CE	NaOH 0,1 M	A	1:10	0
Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους	UE	Ethanol/NaOH (45:55)	B	1:20	1
Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Ένζυμα	EE	Methanol/NaOH (45:55)	C	Συγκέντρωση Ενζύμου	Κωδικός
		Phosphate buffer pH=7	D	10 mg	0
				20 mg	1
Ισχύς Υπερήχων	Κωδικός	Χρόνος	Κωδικός		
150	-1	5	-1		
450	0	10	0		
750	1	20	1		

5.8 Στατιστική επεξεργασία

Η επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας στις ιδιότητες των προϊόντων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας επίσης, το λογισμικό Statistica (Statistica Release 10, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p < 0,05$. Για την ανάλυση των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα και σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο χρησιμοποιήθηκε στατιστική ανάλυση διασποράς (ANOVA) και έλεγχοι με την τεχνική του «Tukey».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° : ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

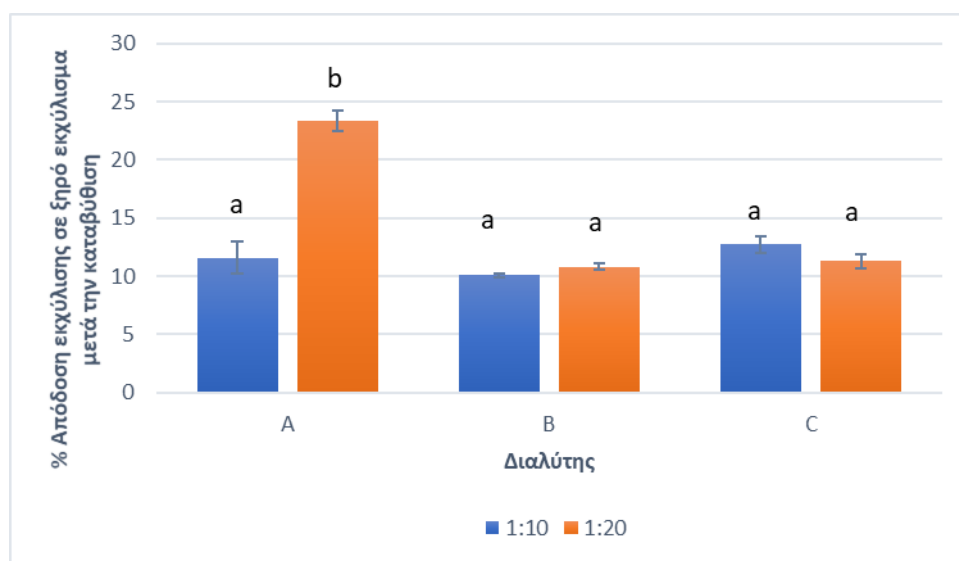
6.1 Απόδοση εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα BSG μετά την καταβύθιση

Μία παράμετρος η οποία είναι απαραίτητη να μελετηθεί σχετικά με την αποδοτικότητα της μεθόδου της εκχύλισης, είναι η απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων των εκχυλίσεων για τις μεθόδους των συμβατικών εκχυλίσεων και των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους. Ο υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης εκφράζεται ως ποσοστό του ξηρού βάρους μετά το στάδιο της καταβύθισης προς το ξηρό βάρος του δείγματος της πρώτης ύλης. Η εξίσωση υπολογισμού είναι η ακόλουθη:

$$\% \text{ Απόδοση εκχύλισης} = \frac{\text{Ξηρό Βάρος Εκχυλίσματος Μετά Την Καταβύθιση}}{\text{Ξηρό Βάρος Πρώτης Ύλης}} \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

6.1.1 Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος συμβατικών εκχυλίσεων BSG

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων των εκχυλίσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση που αφορούν στις συμβατικές εκχυλίσεις για τη χρήση κάθε διαφορετικού διαλύτη και της διαφορετικής αναλογίας στερεής βιομάζας και διαλύτη που μελετάται.



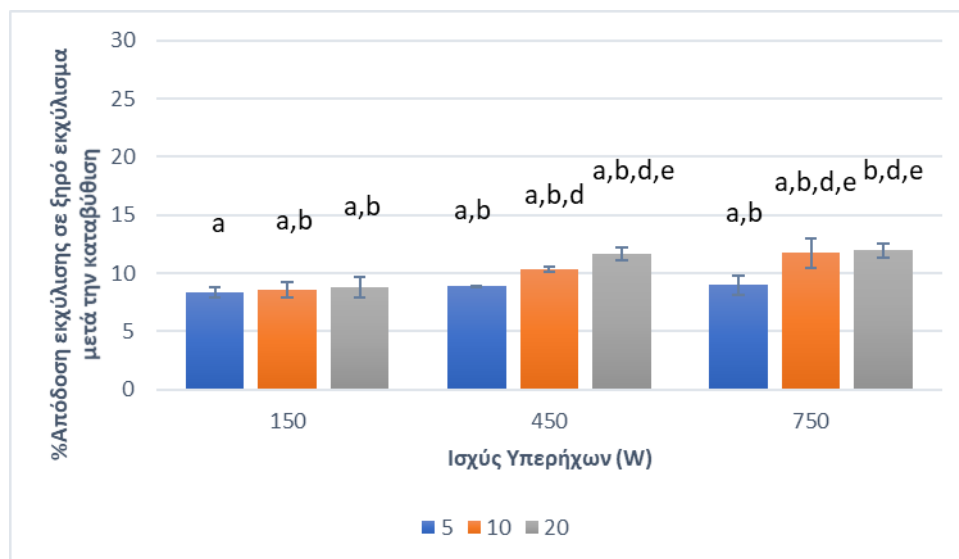
Διάγραμμα 1. Αποδόσεις συμβατικών εκχυλίσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης για τα BSG, εμφανίζεται, με στατιστικά σημαντική διαφορά, για το διαλύτη NaOH 0,1 M και την αναλογία στερεής βιομάζας - διαλύτη 1:20 (23,34% ± 0,89%). Ύστερα ακολουθεί η απόδοση για τη συνθήκη της εκχύλισης με χρήση διαλύτη Methanol/NaOH (45:55), για την αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη 1:10 (12,72% ± 0,71%). Η τρίτη μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα, παρατηρείται για τη μικρότερη αναλογία του υδροξειδίου του νατρίου (11,59% ± 1,38%). Ως προς την ανάλυση των αποτελεσμάτων για κάθε διαλύτη ξεχωριστά, γίνεται αντιληπτό πως στους διαλύτες NaOH 0,1 M και Ethanol/NaOH (45:55), παρατηρούνται μεγαλύτερες αποδόσεις στις εκχυλίσεις της αναλογίας 1:20, σε αντίθεση με το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55), όπου η αναλογία 1:10, φαίνεται να παρουσιάζει καλύτερη απόδοση, οι διαφορές όμως δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

6.1.2 Απόδοσεις ξηρού εκχυλίσματος εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για τα BSG

6.1.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη NaOH 0,1 M

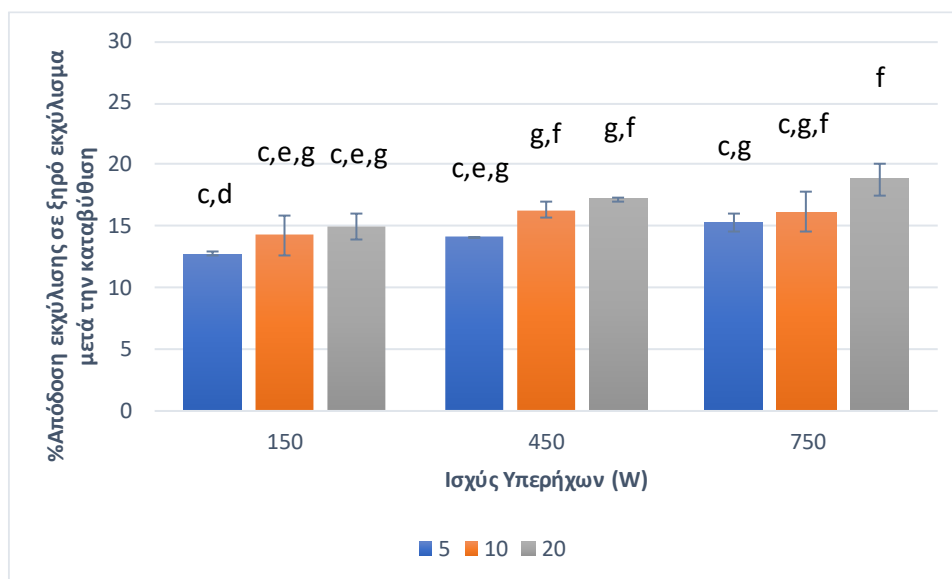
Στο Διάγραμμα 2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις αποδόσεις σε ξηρό εκχύλιμα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για το διαλύτη υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M και που αφορούν στα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:10 για τη στερεή βιομάζα με το διαλύτη.



Διάγραμμα 2. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:10

Αντλώντας δεδομένα από το Διάγραμμα 2, παρατηρείται πως τη μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλιμα μετά την καταβύθιση, παρουσιάζει η εκχύλιση με συνθήκες ισχύος 750 W και χρόνου κατεργασίας τα 20 λεπτά (11,98% ± 0,60%). Ακολουθεί η εκχύλιση με συνθήκες τα 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 10 λεπτά (11,74% ± 1,25%) και η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση, παρατηρείται στο πείραμα με συνθήκες τα 450 W και χρόνο τα 20 λεπτά (11,62% ± 0,54%). Αξιολογώντας τα αποτελέσματα του διαγράμματος που σχετίζονται με την εφαρμογή της κάθε ισχύος ξεχωριστά, γίνεται φανερό πως με την κατεργασία των BSG σε ισχύ 150 W, λαμβάνεται μικρότερη ποσότητα ξηρού καταβυθισμένου εκχυλίσματος σε σχέση με τις άλλες δύο τιμές ισχύος. Επιπλέον παρατηρείται πως για ισχύ υπερήχων 150 W, όταν αυξάνεται ο χρόνος κατεργασίας, αυξάνεται και η απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλιμα, με μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης τα 8,80% ± 0,92% για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Όσον αφορά στις τιμές ισχύος για 450 W και 750 W, παρατηρείται πως ο χρόνος κατεργασίας παρουσιάζει την ίδια επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλιμα, δηλαδή για τα πειράματα με εφαρμογή της ίδιας ισχύος, παρατηρείται μεγαλύτερη τιμή απόδοσης για χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά και μικρότερη για χρόνο 5 λεπτά. Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλιμα μετά την καταβύθιση και αφορούν στην επίδραση της ισχύος για ίδιο χρόνο κατεργασίας, αποδεικνύουν πως όταν αυξάνεται η ισχύς των υπερήχων για ίδιο χρόνο εκχύλισης, οδηγεί σε μεγαλύτερες τιμές απόδοσης. Πιο συγκεκριμένα, για χρόνο εκχύλισης 5 λεπτά, η τιμή της απόδοσης είναι μεγαλύτερη στην ισχύ των 750 W (8,80% ± 0,92%) και μικρότερη στην ισχύ των 150 W (8,35% ± 0,47%). Ομοίως, παρατηρείται η ίδια επίδραση και στους χρόνους εκχύλισης των 10 και 20 λεπτών.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για το διαλύτη υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M και που αφορούν τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:20 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.



Διάγραμμα 3. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:20

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 3, γίνεται αντιληπτό πως και στην αναλογία 1:20 στερεής βιομάζας διαλύτη, η απόδοση εκχύλισης σε ξηρό καταβυθισμένο εκχύλισμα είναι μεγαλύτερη για ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά (18,78% ± 1,25%). Ακολουθεί ως αμέσως μεγαλύτερη απόδοση αυτή της εκχύλισης με συνθήκες τα 450 W και χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά (17,18% ± 0,12%) και έπεται η εκχύλιση του πειράματος με συνθήκες τα 450 W και χρόνο τα 10 λεπτά (16,30% ± 0,64%). Αναλύοντας την επίδραση του παράγοντα του χρόνου της εκχύλισης διατηρώντας σταθερή την ισχύ των υπερήχων, παρατηρείται πως και στις τρεις τιμές ισχύος ο χρόνος εκχύλισης 20 λεπτά, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή σε σύγκριση με τους άλλους δύο χρόνους, όπως συμβαίνει και στην αναλογία 1:10 της στερεής βιομάζας - διαλύτη. Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση και αφορούν στην επίδραση της ισχύος για ίδιο χρόνο κατεργασίας, αποδεικνύουν πως όταν αυξάνεται η ισχύς των υπερήχων για ίδιο χρόνο εκχύλισης, οδηγεί σε μεγαλύτερες τιμές απόδοσης, για τους χρόνους των 5 και 20 λεπτών. Όσον αφορά στο χρόνο των 10 λεπτών όμως, παρατηρείται μία διαφοροποίηση στη διαμόρφωση της απόδοσης για την εκχύλιση στα 450 W (16,30% ± 0,64%), η οποία να μεν είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των 150 W (14,26% ± 1,65%), όμως φαίνεται να είναι μεγαλύτερη και από την ισχύ των 750 W (16,12% ± 1,63%), η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική, όπως φαίνεται από τη στατιστική ανάλυση.

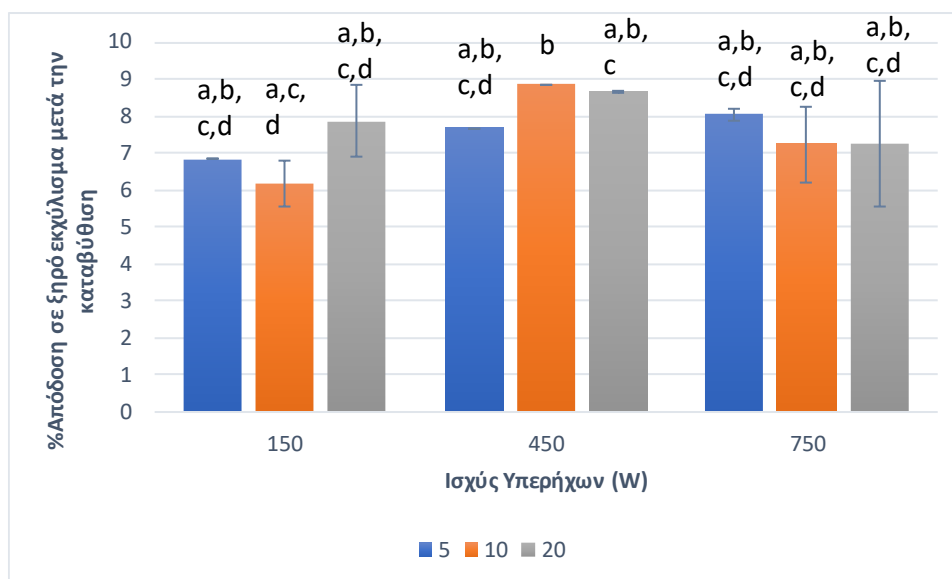
Στα παραπάνω αποτελέσματα, και για τις δύο αναλογίες (1:10 και 1:20) έχει πραγματοποιηθεί στατιστική επεξεργασία. Όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα, οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα στην αναλογία 1:20, παρουσιάζονται σημαντικά μεγαλύτερες για όλο το εύρος των συνθηκών που μελετώνται. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται χάρη στην αυξημένη παρουσία υδατικής φάσης η οποία συμβάλλει στην ενίσχυση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη διάσπαση των κυττάρων της βιομάζας αυξάνοντας τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. [58] Χαρακτηριστικά η μικρότερη απόδοση σε ξηρό καταβυθισμένο

εκχύλισμα για την αναλογία 1:10 είναι αυτή που προκύπτει με χρήση 150 W και χρόνο τα 5 λεπτά και διαμορφώνεται στην τιμή $8.35\% \pm 0.47\%$, ενώ η αντίστοιχη για την αναλογία 1:20, στην τιμή $12,72\% \pm 0,16\%$. Αναλόγως, η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για την αναλογία 1:10, εμφανίζεται στις συνθήκες των 750 W και 20 λεπτών και αντιστοιχεί στην τιμή $11.98\% \pm 0.60\%$, με την τιμή που αντιπροσωπεύει το ίδιο πείραμα για την αναλογία 1:20, να διαμορφώνεται στο $18,78\% \pm 1,25\%$. Εκτός των παραπάνω, παρατηρείται επίσης πως για κάθε τιμή ισχύος σε ίδιους χρόνους εκχύλισης, τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα, της αναλογίας 1:20 επιφέρουν καλύτερες αποδόσεις εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα της αναλογίας 1:10. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει για τη μεγαλύτερη αναλογία στερεής βιομάζας όσον αφορά σε κάθε διαφορετικό χρόνο εκχύλισης στην ίδια ισχύ υπερήχων. Τέλος, παρατηρείται ότι η αύξηση της ισχύος πέραν των 450 W δεν επιφέρει σημαντική αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα, επομένως η τιμή αυτή της ισχύος θεωρείται βέλτιστη για το συγκεκριμένο διαλύτη και συμφωνεί με τα αναγραφόμενα στη βιβλιογραφία όπου παρατηρείται πως η μελέτη της επίδρασης της ισχύος των υπερήχων στην απομόνωση πρωτεϊνών για το συγκεκριμένο διαλύτη, εφαρμόζεται γύρω από μέσες τιμές οι οποίες δεν υπερβαίνουν την ισχύ των 350 W. [53]

Όπως παρατηρείται συγκρίνοντας πλέον τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση, και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης (συμβατική και με υπερήχους), φαίνεται πως η μεγαλύτερη απόδοση παρουσιάζεται στη συμβατική εκχύλιση για την αναλογία 1:20. Συνολικά όμως οι αποδόσεις των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους, για την ίδια αναλογία, παρουσιάζουν μεγαλύτερες αποδόσεις σε σύγκριση με την αναλογία 1:10 για τη συμβατική εκχύλιση με διαλύτη το NaOH 0,1 M. Αντίστοιχα η απόδοση της συμβατικής εκχύλισης με αναλογία 1:10, παρουσιάζεται μεγαλύτερη από τις αποδόσεις των εκχυλίσεων UAE αναλογίας 1:10, με εξαίρεση τις αποδόσεις των πειραμάτων με συνθήκες τα 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά ($11,61\% \pm 0,54\%$), τα 750 W για χρόνο 10 λεπτά ($11,74\% \pm 1,25\%$) και τα 750 W για 20 λεπτά κατεργασίας ($11,98\% \pm 0,60\%$). Επομένως η εκχύλιση παρουσία υπερήχων αναλογίας 1:20 και για συνθήκες 750 W και 20 λεπτά ή 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση πρωτεϊνών έναντι της συμβατικής εκχύλισης, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο και τη θερμοκρασία επεξεργασίας.

6.1.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

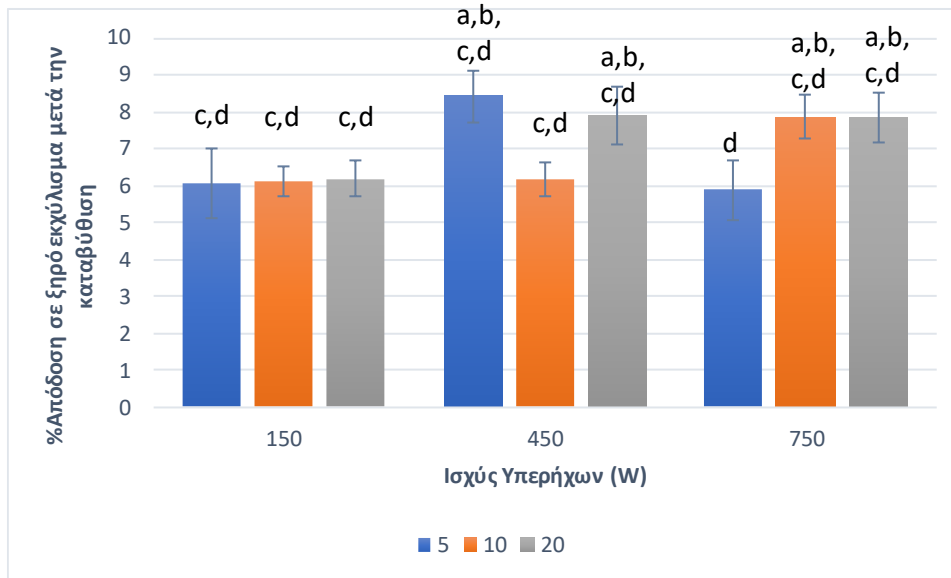
Στο Διάγραμμα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για τα πειράματα που αφορούν στη χρήση του συνδυασμού διαλυτών Ethanol/NaOH (45:55) για την αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη 1:10.



Διάγραμμα 4. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 4, φαίνεται πως η καλύτερη απόδοση σε ξηρό βάρος της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) της αναλογίας 1:10, σημειώνεται για συνθήκες εκχύλισης τα 450 W ως ισχύ υπερήχων και τα 10 λεπτά χρόνο κατεργασίας (8,86%). Η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα παρατηρείται επίσης για ισχύ υπερήχων 450 W, αλλά για χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά (8,65% ± 0,01%). Η τρίτη μεγαλύτερη απόδοση ξηρού εκχυλίσματος εντοπίζεται για τις συνθήκες ισχύος των 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 5 λεπτά (8,05% ± 0,17%). Επιπλέον η χαμηλότερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα διαμορφώνεται στην τιμή 6,17% ± 0,61% και αντιστοιχεί στην εκχύλιση όπου εφαρμόστηκαν τα 150 W ως ισχύς υπερήχων και τα 10 λεπτά ως χρόνος κατεργασίας. Τα πειράματα των δεκάλεπτων και των εικοσάλεπτων εκχυλίσεων οδηγούν σε παρόμοιες αποδόσεις και οδηγούν στο συμπέρασμα πως η περαιτέρω αύξηση του χρόνου της εκχύλισης ενδεχομένως αποτελεί εμπόδιο στη λειτουργία του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης. [53] Για χρόνο εκχύλισης 5 λεπτά, παρατηρείται πως όταν αυξάνεται η ισχύς των υπερήχων, αυξάνεται και η απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα, με τη μεγαλύτερη απόδοση να σημειώνεται στην ισχύ των 750 W και τη μικρότερη στα 150 W. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και για τις δεκάλεπτες εκχυλίσεις όσον αφορά στην επίδραση της ισχύος υπερήχων, όμως σε αυτήν την περίπτωση, η ισχύς των 450 W παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση και από την αντίστοιχη της εκχύλισης για 750 W,. [53] Ως προς τις εικοσάλεπτες εκχυλίσεις, παρατηρείται πως η μικρότερη απόδοση εντοπίζεται για την ισχύ 750 W, ενώ η μεγαλύτερη για την ισχύ 450 W.

Το Διάγραμμα 5 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αποδόσεων ξηρού εκχυλίσματος που αφορούν στις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20.



Διάγραμμα 5. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των αποδόσεων των εκχυλίσεων για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση, αντιστοιχεί σε ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 5 λεπτά (8,42% ± 0,70%). Η δεύτερη μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα (χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από την πρώτη) εντοπίζεται στην εκχύλιση με ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά (7,90% ± 0,80%) και η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα αντιστοιχεί στο πείραμα με ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο κατεργασίας 10 λεπτά. Η λιγότερο επιτυχημένη απόδοση εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα παρουσιάζεται στο πείραμα που μελετήθηκε η εφαρμογή της ισχύος των 150 W και ο χρόνος εκχύλισης των 5 λεπτών (6,09% ± 0,95%). Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου της εκχύλισης, για τις εκχυλίσεις ισχύος 150 W παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση με τη μεγαλύτερη απόδοση να εντοπίζεται για χρόνο 20 λεπτά (6,20% ± 0,95%) και τη μικρότερη για χρόνο 5 λεπτά (6,09% ± 0,95). Για την ομάδα εκχυλίσεων με ισχύ υπερήχων τα 450 W, παρατηρείται πως η υψηλότερη απόδοση προκύπτει για χρόνο 5 λεπτά (8,42% ± 0,7) ενώ η χαμηλότερη για χρόνο 10 λεπτά (6,19% ± 0,45). Τέλος η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στις εκχυλίσεις με ισχύ υπερήχων 750 W συμβάλλει θετικά στην αύξηση της απόδοσης με τη μεγαλύτερη τιμή να εντοπίζεται στην εκχύλιση για χρόνο 10 λεπτά (7,87% ± 0,61%) η οποία όμως δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά από την απόδοση της εκχύλισης με χρόνο 20 λεπτά. Όσον αφορά στην επίδραση της ισχύος στην απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση, παρατηρείται πως σημειώνεται αύξηση με την αύξησή της. Τέλος, παρατηρείται ότι η αύξηση της ισχύος πέραν των 450 W δεν επιφέρει σημαντική αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα, επομένως η τιμή αυτή της ισχύος θεωρείται βέλτιστη και για το συγκεκριμένο διαλύτη.

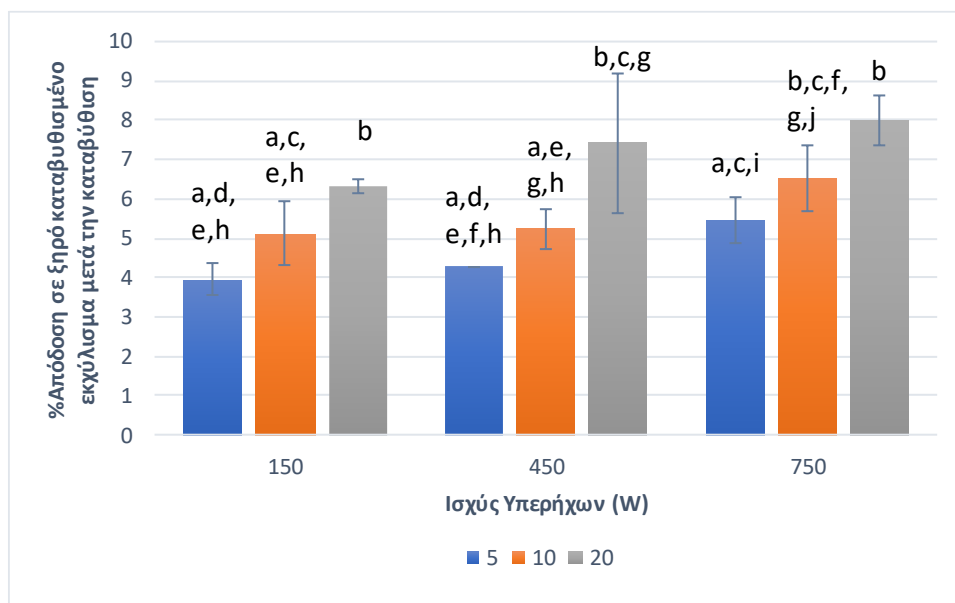
Στα παραπάνω αποτελέσματα, και για τις δύο αναλογίες (1:10 και 1:20) έχει πραγματοποιηθεί στατιστική επεξεργασία. Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 4 και 5 δεν αποσαφηνίζεται η επίδραση της παραμέτρου της αναλογίας στερεής βιομάζας διαλύτη για την απόδοση των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους και τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη. Χαρακτηριστικά η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα για το σύνολο και των δύο αναλογιών, παρατηρείται στην εκχύλιση για ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά και σημειώνεται

στην αναλογία 1:10 (8,86%). Η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση, εντοπίζεται στην εκχύλιση με ισχύ υπερήχων ομοίως τα 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά της αναλογίας 1:10 (8,65% ± 0,013%). Η τρίτη μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα, παρατηρείται στην εκχύλιση για την αναλογία 1:20 και ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά (8,42% ± 0,7%). Συνολικά παρατηρείται πως και για τις δύο αναλογίες η ισχύς των υπερήχων παρουσιάζει αύξηση στην απόδοση των εκχυλίσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση από την ισχύ των 150 W προς την ισχύ των 450 W, όμως δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές προς αυξητική τάση για την ισχύ των 750 W και για τον συγκεκριμένο διαλύτη, γεγονός το οποίο αποδεικνύει πως η κατεργασία ύστερα από την ισχύ των 450 W δεν επιφέρει πολύ πιο βελτιωμένα αποτελέσματα όπως προέκυψε για την απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα και για το διαλύτη NaOH και επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά. [53]

Λαμβάνοντας υπόψιν συνολικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), παρατηρείται πως η μεγαλύτερη αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε καμία από τις δύο μεθόδους. Επιπλέον παρατηρείται πως οι εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους στο σύνολο των πειραμάτων δεν οδηγούν σε αύξηση ή κοντινές τιμές αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση συγκριτικά με τη συμβατική εκχύλιση.

6.1.2.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Στο Διάγραμμα 6 παρατίθενται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για τα πειράματα που αφορούν στη χρήση του συνδυασμού διαλυτών Methanol/NaOH (45:55) για την αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:10.

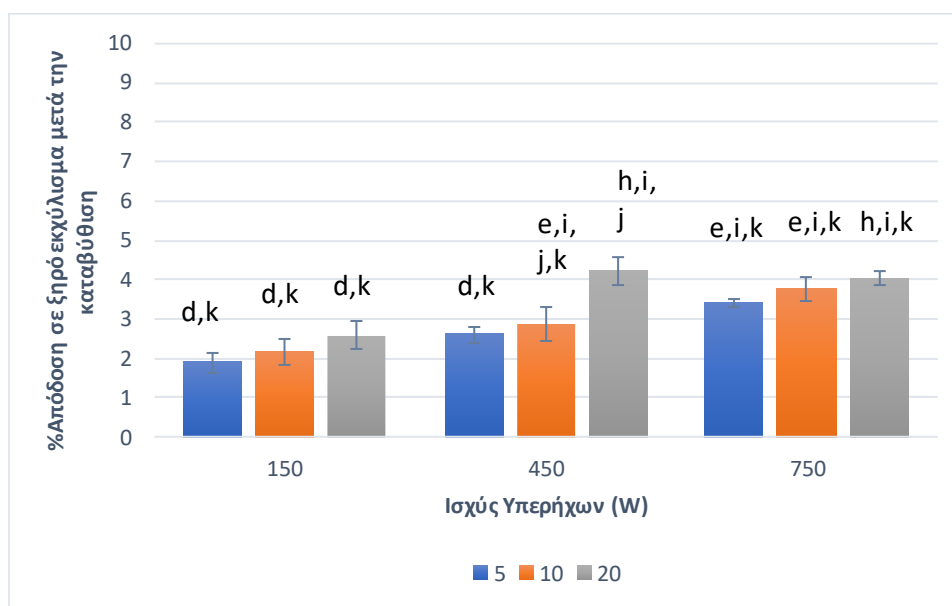


Διάγραμμα 6. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10

Όπως προκύπτει από τα γραφήματα του Διαγράμματος 6, η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) αναλογίας 1:10, συναντάται στο πείραμα με ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά (7,98% ± 0,64%). Η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση αντιστοιχεί στην εκχύλιση με ισχύ 450 W και χρόνο εκχύλισης ομοίως τα 20 λεπτά (7,42% ± 1,77%) και η τρίτη μεγαλύτερη απόδοση προκύπτει από το πείραμα με ισχύ 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 10 λεπτά (6,53% ± 0,85%). Συνολικά

η λιγότερο επιτυχημένη εκχύλιση για την αναλογία 1:10 είναι εκείνη με συνθήκες 150 W και χρόνο τα 5 λεπτά της οποίας η απόδοση διαμορφώνεται στα $3,95\% \pm 0,41\%$. Για τις εκχυλίσεις στις οποίες η ισχύς υπερήχων ρυθμίζεται στα 150 W, παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου οδηγεί και σε αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα, με τη μεγαλύτερη τιμή να διαμορφώνεται για το χρόνο των 20 λεπτών ($6,33\% \pm 0,19\%$), ενώ η μικρότερη για τα 5 λεπτά. Ανάλογη είναι η επίδραση της παραμέτρου του χρόνου και για τις άλλες δύο τιμές ισχύος. Επίσης, παρατηρείται πως η μεταβολή της ισχύος συμβάλλει στατιστικά σημαντικά στην απόδοση της εκχύλισης για όλους τους χρόνους εκχύλισης και μάλιστα η αύξησή της επιφέρει αύξηση της απόδοσης.

Στο Διάγραμμα 7 συγκαταλέγονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:20.



Διάγραμμα 7. Απόδοση ξηρού εκχυλίσματος της UAE για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 7, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για την αναλογία 1:20 και χρήση διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) διαμορφώνεται στην τιμή $4,22\% \pm 0,34\%$ για την εκχύλιση με ισχύ υπερήχων τα 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Η δεύτερη μεγαλύτερη απόδοση αντιστοιχεί στο πείραμα με ισχύ υπερήχων τα 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά ($4,04\% \pm 0,18\%$), ενώ η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση σημειώνεται στην εκχύλιση της ίδιας ισχύος για το χρόνο των 10 λεπτών ($3,78\% \pm 0,31\%$). Η μικρότερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα εντοπίζεται και για την αναλογία 1:20 στο πείραμα με ισχύ υπερήχων τα 150 W και χρόνο εκχύλισης τα 5 λεπτά ($1,89\% \pm 0,27\%$). Η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης, οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα, για όλες τις τιμές ισχύος. Σχετικά με την επίδραση της αύξησης της τιμής ισχύος υπερήχων, παρατηρείται πως σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα εντοπίζεται σε ισχύ 750 W για όλους τους χρόνους εκχύλισης.

Συγκρίνοντας πλέον τις αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για την καταβύθιση για τις δύο αναλογίες στερεής βιομάζας διαλύτη για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55), παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση σημειώνεται για την αναλογία 1:10 ($7,98\% \pm 0,64\%$), ενώ η μικρότερη για την αναλογία 1:20 ($1,89\% \pm 0,27\%$). Συνολικά παρατηρείται πως η αναλογία 1:20 εμφανίζει χαμηλότερες αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα από τις αποδόσεις για την αναλογία 1:10 με εξαίρεση τις αποδόσεις για το πείραμα της αναλογίας 1:20 με ισχύ 450 W και χρόνο 20 λεπτά ($4,22\% \pm 0,34\%$) και

το πείραμα με ισχύ 750 W και χρόνο 20 λεπτά ($4,04\% \pm 0,18\%$) που παρουσιάζουν μεγαλύτερες αποδόσεις από τη μικρότερη απόδοση της αναλογίας 1:10 ($3,95\% \pm 0,41\%$). Εκτός των παραπάνω, παρατηρείται επίσης πως για ίδια τιμή ισχύος σε ίδιους χρόνους εκχύλισης, τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα, της αναλογίας 1:10 επιφέρουν καλύτερες αποδόσεις εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα της αναλογίας 1:20.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 1, 6 και 7, γίνεται φανερό πως η εκχύλιση με διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) για τις δύο αναλογίες στερεής βιομάζας διαλύτη, φαίνεται να μην είναι ικανοποιητική για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα BSG, όπως επιβεβαιώνεται και από τον ποσοτικό προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου στις παρακάτω αναλύσεις.

6.2 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου συμβατικών εκχυλίσεων και εκχυλίσεων UAE για τα BSG

Σημαντικό μέγεθος που χρήζει προσδιορισμού προκειμένου να αξιολογηθεί η μέθοδος της εκχύλισης και οι παράμετροι που επιλέγονται να μελετηθούν, είναι η απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης εξαντλημένων σπόρων κριθαριού αλλά και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος για το εκάστοτε πείραμα. Για τον υπολογισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου, όπως περιγράφεται και παραπάνω, λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης μέσω φωτομέτρησης σε φωτόμετρο UV-Vis και αυτή η απορρόφηση, μεταφράζεται σε συγκέντρωση μέσω της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης είναι η ακόλουθη : $y = 0,9094x + 0,0768$ ($R^2 = 0,9825$).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων των εκχυλίσεων για τη μέθοδο των συμβατικών εκχυλίσεων και των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους.

6.2.1 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG συμβατικών εκχυλίσεων

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων των εκχυλίσεων σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG που αφορούν στις συμβατικές εκχυλίσεις για τη χρήση κάθε διαφορετικού διαλύτη και της διαφορετικής αναλογίας στερεής βιομάζας και διαλύτη που μελετάται.

Πίνακας 4. Απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο συμβατικών εκχυλίσεων BSG

Πείραμα	Διαλύτης	Αναλογία	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
CEA0	NaOH 0,1 M	1:10	$237,63^a \pm 1,09$	$27,53^{a,d} \pm 0,99$
CEA1	NaOH 0,1 M	1:20	$259,29^b \pm 0,93$	$60,52^b \pm 2,53$
CEB0	Ethanol/NaOH (45:55)	1:10	$208,82^c \pm 8,55$	$21,07^{a,c} \pm 1,25$
CEB1	Ethanol/NaOH (45:55)	1:20	$181,77^d \pm 1,09$	$19,70^c \pm 0,64$
CEC0	Methanol/NaOH (45:55)	1:10	$224,98^{a,c} \pm 0,31$	$28,61^d \pm 1,63$
CEC1	Methanol/NaOH (45:55)	1:20	$211,79^c \pm 6,53$	$23,95^{a,c,d} \pm 2,10$

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 γίνεται αντιληπτό πως για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη 1:20, η απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG είναι μεγαλύτερη εν συγκρίσει με την αναλογία 1:10, το ίδιο ισχύει και για την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο σύνολο του ξηρού εκχυλίσματος. Επιπλέον, συγκρινόμενων των αποδόσεων ανά BSG για τις δύο αναλογίες και διαλύτη το NaOH 0,1 M, παρατηρείται πως η αναλογία 1:20 οδηγεί σε διπλασιασμό της απόδοσης σε σχέση με την αναλογία 1:10, όμως δε διαφέρουν πολύ ως προς την περιεκτικότητα του ξηρού εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αύξηση του NaOH 0,1 M στις συμβατικές εκχυλίσεις δεν οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερη απομόνωση των πρωτεϊνών στο σύνολο του εκχυλίσματος. Όσον αφορά στις εκχυλίσεις όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται ο συνδυασμός Ethanol/NaOH (45:55) η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο σύνολο του ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG παρατηρείται μεγαλύτερη στην αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:10 σε σύγκριση με τις περιεκτικότητες στην αναλογία 1:20. Όμως παρατηρείται επίσης πως η απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα για τον ίδιο διαλύτη στην αναλογία 1:20 είναι μεγαλύτερη από την απόδοση στην αναλογία 1:10 κατά 6,90% περίπου, όμως το ξηρό εκχύλισμα της αναλογίας 1:20 εμφανίζεται να είναι σχεδόν κατά 12,95% λιγότερο πλούσιο σε πρωτεΐνες από αυτό της εκχύλισης που μελετάται η αναλογία 1:20. Και στην περίπτωση του διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) συμπεραίνεται πως η αύξηση της ποσότητας του διαλύτη δε συμβάλλει στην αύξηση της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώνονται στο εκχύλισμα. Βιβλιογραφικά διαπιστώνεται πως η εφαρμογή συμβατικών εκχυλίσεων για το συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών, γίνεται σε μικρότερες αναλογίες στερεής βιομάζας – διαλύτη από την αναλογία 1:20 και συγκεκριμένα επιλέγεται η αναλογία 1:10 και 1:15. Συνεπώς συμπεραίνεται πως η αύξηση της ποσότητας του διαλύτη στην προκειμένη περίπτωση θα πρέπει να αναθεωρηθεί καθώς οδηγεί σε σπατάλη διαλύτη δίχως παρουσία βελτιωμένων αποτελεσμάτων. [52], [59] Στην περίπτωση των εκχυλίσεων που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης η Methanol/NaOH (45:55), παρουσιάζεται μεγαλύτερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο στην αναλογία 1:10 σε σχέση με την αναλογία 1:20. Μεγαλύτερη παρουσιάστηκε και η απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για την αναλογία 1:10. Και σε αυτήν την περίπτωση διαλύτη, εξάγεται το συμπέρασμα πως η μεγαλύτερη αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη δε συμβάλλει στην καλύτερη απομόνωση των πρωτεϊνών στο σύνολο του εκχυλίσματος, αντιθέτως η αναλογία 1:10 παρουσιάζει πιο βελτιωμένες αποδόσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου.

Η επιλογή της χρήσης του διαλύτη NaOH 0,1 M στοχεύει στην απομόνωση πρωτεϊνών όπως είναι οι γλουτελίνες οι οποίες απομονώνονται παρουσία αλκαλικής φάσης ενώ ταυτόχρονα η παρουσία της υδατικής φάσης που εμπεριέχεται στο συγκεκριμένο διαλύτη μπορεί να οδηγήσει και στην απομόνωση των αλβουμινών και των γλοβουλινών που διαλύονται σε υδατικά συστήματα. [11], [60] Όπως προκύπτει από την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου που απομονώνεται, γίνεται φανερό πως ο συγκεκριμένος διαλύτης ενισχύει την απομόνωση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Όσον αφορά στην επιλογή του διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), αυτή γίνεται προκειμένου να ενισχυθεί η απομόνωση πρωτεϊνών όπως είναι οι ορδεΐνες (προλαμίνες) που διαλύονται σε αλκοόλες και ταυτόχρονα να ενισχυθεί η αλκαλική φάση του διαλύτη προκειμένου πλέον να απομονωθεί το σύνολο των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού. [11], [52], [59], [60] Κατά παρόμοιο τρόπο επιλέγεται να μελετηθεί η επίδραση μίας ακόμα αλκοόλης στην απομόνωση πρωτεϊνών για αυτό και προκύπτει η χρήση του συνδυασμού Methanol/NaOH (45:55). Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που εξάγονται για τις συμβατικές εκχυλίσεις για τους δύο

τελευταίους διαλύτες, παρατηρείται πως ο διαλύτης Methanol/NaOH (45:55) παρουσιάζει ελαφρώς καλύτερες αποδόσεις.

6.2.2 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος και ανά γραμμάριο BSG εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους

Στο παρόν πεδίο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος μετά την καταβύθιση και ανά γραμμάριο BSG για κάθε διαλύτη ξεχωριστά και για τις δύο αναλογίες στερεής βιομάζας διαλύτη.

6.2.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη NaOH 0,1 M

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις αποδόσεις των εκχυλίσεων ως προς τα mg της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκαν ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο εκχυλίσματος για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M και που αφορούν στα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:10 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 5. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:10

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEA0-1-1	150	5	217,33 ^{a,c} ± 25,19	18,17 ^a ± 1,00
UEA0-10	150	10	214,47 ^a ± 5,60	18,38 ^a ± 1,88
UEA0-11	150	20	227,56 ^{a,c} ± 22,23	20,13 ^{a,c} ± 0,92
UEA00-1	450	5	222,94 ^{a,c} ± 12,28	19,77 ^{a,c} ± 1,12
UEA000	450	10	240,97 ^{a,c,d} ± 0,78	24,81 ^{a,c} ± 0,62
UEA001	450	20	228,11 ^{a,c} ± 11,20	26,52 ^{a,c} ± 0,84
UEA01-1	750	5	225,58 ^{a,c} ± 11,66	20,19 ^{a,c} ± 0,77
UEA010	750	10	222,94 ^{a,c} ± 10,42	26,11 ^{a,c} ± 1,57
UEA011	750	20	227,56 ^{a,c} ± 7,00	27,27 ^c ± 0,77

Παρατηρείται πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:10 σημειώνεται για το πείραμα με ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά, ενώ η αντίστοιχη μικρότερη περιεκτικότητα εντοπίζεται στο πείραμα με ισχύ υπερήχων τα 150 W και χρόνο εκχύλισης τα 5 λεπτά. Όμως, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο σύνολο του ξηρού εκχυλίσματος αντιστοιχεί στην εκχύλιση για ισχύ υπερήχων τα 450 W και χρόνο εκχύλισης τα 10 λεπτά. Επιπλέον παρατηρείται πως για την κάθε διαφορετική τιμή ισχύος, η αύξηση του χρόνου οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο εξαντλημένων σπόρων κριθαριού. Ωστόσο, δε φαίνεται να ισχύει το ίδιο και για την απόδοση των πρωτεϊνών στο σύνολο του ξηρού εκχυλίσματος, όμως οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίστοιχα, για κάθε διαφορετικό χρόνο εκχύλισης σημειώνεται μεγαλύτερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG όταν αυξάνεται η ισχύς των υπερήχων. Σχετικά με την επίδραση της ισχύος της εκχύλισης, η περιεκτικότητα των ξηρών εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες αυξάνεται με εξαίρεση τα 10 λεπτά, όπου παρουσιάζεται μεγαλύτερη τιμή στα 450 W, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Τέλος παρατηρείται πως η αύξηση της ισχύος των υπερήχων πέραν των 450 W δεν οδηγεί σε σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, γεγονός το

οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία σε σχέση με την επίδραση της αύξησης της ισχύος των υπερήχων. [53]

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις αποδόσεις σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για το διαλύτη υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M και που αφορούν τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:20 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 6. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη NaOH 0,1 M και αναλογία 1:20

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEA1-1-1	150	5	311,46 ^{b,d} ± 10,89	39,64 ^b ± 1,88
UEA1-10	150	10	293,20 ^{c,d,e} ± 33,59	41,53 ^{b,d} ± 0,04
UEA1-11	150	20	324,20 ^{b,e} ± 6,53	48,37 ^{d,e} ± 2,43
UEA10-1	450	5	318,20 ^{b,e} ± 5,18	44,93 ^{b,d,g} ± 0,65
UEA100	450	10	282,21 ^{a,d,e} ± 49,45	46,17 ^{b,e} ± 3,64
UEA101	450	20	312,23 ^{b,d} ± 26,28	53,63 ^{e,f} ± 3,12
UEA11-1	750	5	308,05 ^{b,d} ± 9,18	47,04 ^{b,e} ± 0,80
UEA110	750	10	317,62 ^{b,e} ± 14,00	51,31 ^{e,g} ± 3,44
UEA111	750	20	326,74 ^{b,e} ± 6,06	61,39 ^f ± 5,21

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 6, αποδεικνύεται πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο τόσο ανά γραμμάριο BSG όσο και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος εντοπίζεται και πάλι για ισχύ υπερήχων τα 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά. Επιπλέον συμπεραίνεται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης για κάθε τιμή ισχύος υπερήχων οδηγεί και σε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG. Παρατηρείται επίσης πως η αύξηση της ισχύος της εκχύλισης για ίδιους χρόνους εκχύλισης, οδηγεί σε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται χάρη στην ενίσχυση της διάρρηξης των κυτταρικών τοιχωμάτων της πρώτης ύλης εξαιτίας της ενίσχυσης του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης λόγω της αυξημένης παρουσίας υπερήχων. [53] Ωστόσο φαίνεται πως η αύξηση της ισχύος δεν επιδρά με ξεκάθαρο τρόπο και στην απόδοση των εκχυλίσεων σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, αλλά οι μεταξύ τους διαφορές δε φαίνονται να είναι στατιστικά σημαντικές.

Τα αποτελέσματα των Πινάκων 5 και 6 οδηγούν στο συμπέρασμα πως η μεγαλύτερη αναλογία ξηρής βιομάζας-διαλύτη συμβάλλει θετικά στην ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεϊνών ανά γραμμάριο BSG και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος σε όλα τα πειράματα που ενεργήθηκαν για τη μελέτη της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Συνεπώς η αύξηση της ποσότητας του NaOH 0,1 M είναι χρήσιμη προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών στο εκχύλισμα όσον αφορά στις εκχύλισεις υποβοηθούμενες με υπερήχους σε αντίθεση με τη συμβατική εκχύλιση. Επιπλέον γίνεται φανερό πως η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για την αναλογία 1:20, εξασφαλίζει την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεϊνών στο εκχύλισμα σε πολύ μικρότερο χρόνο και εξοικονομώντας ενέργεια καθώς δε χρησιμοποιείται θερμότητα για την κατεργασία του δείγματος εν συγκρίσει με τη συμβατική εκχύλιση για την ίδια αναλογία. Το γεγονός

αυτό οφείλεται στην ενίσχυση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης που προάγεται λόγω της αυξημένης παρουσίας υδατικής φάσης. [58] Ως προς τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για την αναλογία 1:10, παρατηρείται πως η συμβατική εκχύλιση εμφανίζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος σε σχέση με τις υποβοηθούμενες με υπερήχους, με εξαίρεση την εκχύλιση για ισχύ υπερήχων τα 450 W και χρόνο εκχύλισης τα 10 λεπτά. Ως εκ τούτου συμπεραίνεται πως η αναλογία 1:10 δεν ενδείκνυται για την απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση υπερήχων, σε αντίθεση με την αναλογία 1:20. Συνολικά συμπεραίνεται πως ο βέλτιστος συνδυασμός ως προς την απομόνωση πρωτεϊνών ανά γραμμάριο BSG και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, αποδεικνύεται η εκχύλιση με ισχύ υπερήχων 750 W, χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά και αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:20.

6.2.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις περιεκτικότητες σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο εκχυλίσματος για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και που αφορούν τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:10 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 7. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEB0-1-1	150	5	223,42 ^{a,b}	14,42 ^{a,c,d}
UEB0-10	150	10	214,91 ^{a,b} ± 7,46	13,29 ^{a,c,d} ± 1,76
UEB0-11	150	20	207,10 ^{a,b} ± 11,97	16,37 ^{a,b,d} ± 1,21
UEB00-1	450	5	216,23 ^{a,b}	16,61 ^{a,b}
UEB000	450	10	185,88 ^{a,b}	16,47 ^{a,b}
UEB001	450	20	240,36 ^a ± 42,45	20,14 ^b ± 2,25
UEB01-1	750	5	168,18 ^{a,b} ± 24,10	13,55 ^{a,c,d} ± 1,22
UEB010	750	10	202,60 ^{a,b} ± 1,87	14,67 ^{a,c,d} ± 1,57
UEB011	750	20	198,56 ^{a,b} ± 22,37	15,01 ^{a,c,d} ± 1,33

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG εντοπίζεται στην εκχύλιση που μελετάται η χρήση ισχύος υπερήχων τα 450 W και χρόνου 20 λεπτά. Για την ίδια εκχύλιση συναντάται και η μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο ξηρό εκχύλισμα. Η αμέσως μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο τόσο ανά γραμμάριο BSG όσο και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος εντοπίζεται για την εκχύλιση με ισχύ υπερήχων επίσης τα 450 W και χρόνο εκχύλισης τα 5 λεπτά. Η τρίτη μεγαλύτερη απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG παρατηρείται για την ίδια ισχύ και χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά, σε αυτήν την περίπτωση όμως διαφοροποιείται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος που παρατηρείται να είναι υψηλότερη στην εκχύλιση για ισχύ 150 W και χρόνο εκχύλισης 5 λεπτά. Η μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG παρατηρείται για την εκχύλιση με ισχύ 150 W και χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά, ενώ η χαμηλότερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος εντοπίζεται για εκχύλιση ισχύος 750 W και χρόνο εκχύλισης τα 5 λεπτά. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ανά

BSG, η αύξηση του χρόνου οδηγεί σε αύξηση της περιεκτικότητας για όλες τις τιμές ισχύος που μελετώνται. Ενώ παρουσιάζεται μέγιστη τιμή για τα 450 W και για τους τρεις χρόνους εκχύλισης.

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις αποδόσεις σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH και που αφορούν τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:20 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 8. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEB1-1-1	150	5	164,44 ^b ± 7,62	11,62 ^{d,c,e} ± 1,03
UEB1-10	150	10	163,34 ^b ± 19,35	10,84 ^{c,e} ± 0,98
UEB1-11	150	20	210,07 ^{a,b} ± 0,93	14,33 ^{a,e} ± 1,32
UEB10-1	450	5	198,87 ^{a,b} ± 24,62	10,82 ^{c,e} ± 0,98
UEB100	450	10	193,55 ^{a,b} ± 1,55	12,90 ^{a,e} ± 0,73
UEB101	450	20	212,56 ^{a,b} ± 32,17	14,06 ^{a,e} ± 1,00
UEB11-1	750	5	195,89 ^{a,b} ± 0,78	11,52 ^{c,e} ± 1,50
UEB110	750	10	183,36 ^{a,b} ± 15,25	13,62 ^{a,e} ± 0,82
UEB111	750	20	181,37 ^{a,b} ± 21,62	14,30 ^{a,e} ± 0,89

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 8 παρατηρείται πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης εντοπίζεται στο πείραμα με ισχύ υπερήχων τα 150 W και χρόνο εκχύλισης τα 20 λεπτά, η αμέσως μεγαλύτερη περιεκτικότητα εμφανίζεται για την εκχύλιση ισχύος 750 W και χρόνο ομοίως τα 20 λεπτά και ακολουθεί η εκχύλιση των 450 W για τον ίδιο χρόνο. Η χαμηλότερη απόδοση εντοπίζεται για το πείραμα με ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 5 λεπτά. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος παρατηρείται πως η υψηλότερη τιμή εντοπίζεται για την εκχύλιση με ισχύ υπερήχων τα 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Η επόμενη υψηλότερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο σημειώνεται για την εκχύλιση με ισχύ 150 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης, οδηγεί σε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά g BSG. Μελετώντας την επίδραση της ισχύος, παρατηρείται πως η ισχύς δεν επιδρά σημαντικά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για κάθε χρόνο εκχύλισης. Αντίστοιχα η απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος εμφανίζεται να είναι υψηλότερη για την ισχύ των 450 W και χαμηλότερη για την ισχύ των 150 W, ενώ δεν παρατηρείται ξεκάθαρη επίδραση ως προς το χρόνο εκχύλισης.

Συνολικά αξιολογώντας τα αποτελέσματα των Πινάκων 7 και 8 παρατηρείται πως η αναλογία 1:20 παρουσιάζει μειωμένες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG σε σχέση με την αναλογία 1:10 οι οποίες όμως δε φαίνεται να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως και οι περιεκτικότητες σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος εμφανίζονται υψηλότερες για την αναλογία 1:10. Μάλιστα η υψηλότερη τιμή απόδοσης πρωτεϊνικού περιεχομένου τόσο ανά γραμμάριο BSG όσο και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, εντοπίζεται για την αναλογία 1:10 και ισχύ υπερήχων τα 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Συγκεντρωτικά παρατηρείται πως περαιτέρω αύξηση της ισχύος των υπερήχων πέραν της τιμής των 450 W δεν

επιφέρει σημαντική αύξηση στην απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως η μελέτη της επίδρασης της ισχύος για το συγκεκριμένο διαλύτη δε χρήζει διερεύνησης για τιμές υψηλότερων αποδόσεων αλλά κυρίως μεσαίων. Επιπλέον παρατηρείται πως η επίδραση του χρόνου της εκχύλισης επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην αύξηση της απόδοσης σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τη χρήση του διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης (συμβατική και εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους) παρατηρείται πως η απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους οδηγούν σε μικρότερες αποδόσεις σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από τη μείωση της πολικότητας στο σύστημα της εκχύλισης παρουσία της αιθανόλης. Η πολικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό που επηρεάζει τη δράση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαίωσης και μάλιστα η μείωση της πολικότητας είναι ένας παρεμποδιστικός παράγοντας για την ενίσχυση του φαινομένου, όπως καταδεικνύεται από προγενέστερες μελέτες [61]. Επιπλέον παρατηρείται πως όσον αφορά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος η συνθήκη που οδηγεί σε αποτελέσματα κοντινά σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση είναι εκείνη για αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:10, ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά, η οποία θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως αντικατάσταση της συμβατικής εκχύλισης για το συγκεκριμένο σύστημα. Επιπλέον παρατηρείται πως η αναλογία 1:10 οδηγεί σχεδόν για όλες τις συνθήκες των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους σε αποτελέσματα που προσεγγίζουν τις αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος σε σχέση με τις συμβατικές εκχυλίσεις. Για τις εκχυλίσεις αναλογίας 1:20 παρατηρείται πως αυτές οι αποδόσεις είναι περισσότερο υψηλές και προσεγγίζουν τις αποδόσεις της ίδιας αναλογίας για τη συμβατική εκχύλιση για τιμές ισχύος 450 W και 750 W.

6.2.2.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τις περιεκτικότητες σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο εκχυλίσματος για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και που αφορούν τα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:10 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 9. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:10

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEC0-1-1	150	5	156,41 ^a ± 3,73	6,16 ^{a,d} ± 0,62
UEC0-10	150	10	166,97 ^{a,b} ± 14,00	7,58 ^{a,c} ± 0,61
UEC0-11	150	20	141,46 ^a ± 9,64	8,96 ^{c,f} ± 0,88
UEC00-1	450	5	165,98 ^{a,b} ± 12,91	7,09 ^{a,c} ± 0,55
UEC000	450	10	157,29 ^a ± 4,97	7,54 ^{a,c} ± 0,54
UEC001	450	20	203,75 ^b ± 20,75	16,89 ^e ± 0,97
UEC01-1	750	5	152,23 ^a ± 15,32	8,50 ^{c,f} ± 0,76
UEC010	750	10	140,25 ^a ± 18,51	9,09 ^{c,f} ± 0,02
UEC011	750	20	139,81 ^a ± 3,89	10,30 ^f ± 1,16

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 παρατηρείται πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG και ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, εντοπίζεται για το πείραμα με ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Και για τις τρεις τιμές ισχύος παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης οδηγεί και σε αύξηση των πρωτεϊνών που λαμβάνονται ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης. Το ίδιο παρατηρείται και ως προς την αύξηση της ισχύος, με εξαίρεση τις εκχυλίσεις που πραγματοποιούνται στα 20 λεπτά, όπου η ισχύς των 750 W επιδρά αρνητικά στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών. Όσον αφορά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μελετώμενων συνθηκών.

Ο Πίνακας 10 αποτελείται από τα δεδομένα που σχετίζονται με τις αποδόσεις σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης BSG και ανά γραμμάριο πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και που αφορούν στα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η αναλογία 1:20 της στερεής βιομάζας με το διαλύτη.

Πίνακας 10. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και αναλογία 1:20

Πείραμα	Ισχύς Υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος	mg πρωτεΐνης/g BSG
UEC1-1-1	150	5	133,53 ^a ± 15,23	1,98 ^b ± 0,05
UEC1-10	150	10	164,66 ^{a,b} ± 0,16	3,52 ^{b,g} ± 0,31
UEC1-11	150	20	135,52 ^a ± 5,60	3,65 ^{b,g,h} ± 0,28
UEC10-1	450	5	141,57 ^a ± 2,64	3,69 ^{b,g,h} ± 0,23
UEC100	450	10	146,95 ^a ± 1,56	4,21 ^{b,d,g,h} ± 0,43
UEC101	450	20	129,25 ^a ± 15,63	5,55 ^{a,g} ± 0,46
UEC11-1	750	5	166,75 ^{a,b} ± 1,56	5,70 ^{a,g} ± 0,21
UEC110	750	10	134,53 ^a ± 4,20	5,13 ^{d,g,h} ± 0,43
UEC111	750	20	144,75 ^a ± 1,56	5,85 ^{a,h} ± 0,33

Η εκχύλιση με ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά παρουσιάζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG. Η αύξηση τόσο της ισχύος όσο και του χρόνου εκχύλισης επιδρούν θετικά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Όμως, η αύξηση της ισχύος από 450 σε 750 W δεν παρουσιάζει σημαντικά αποδοτικότερα αποτελέσματα. Όσον αφορά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μελετώμενων συνθηκών.

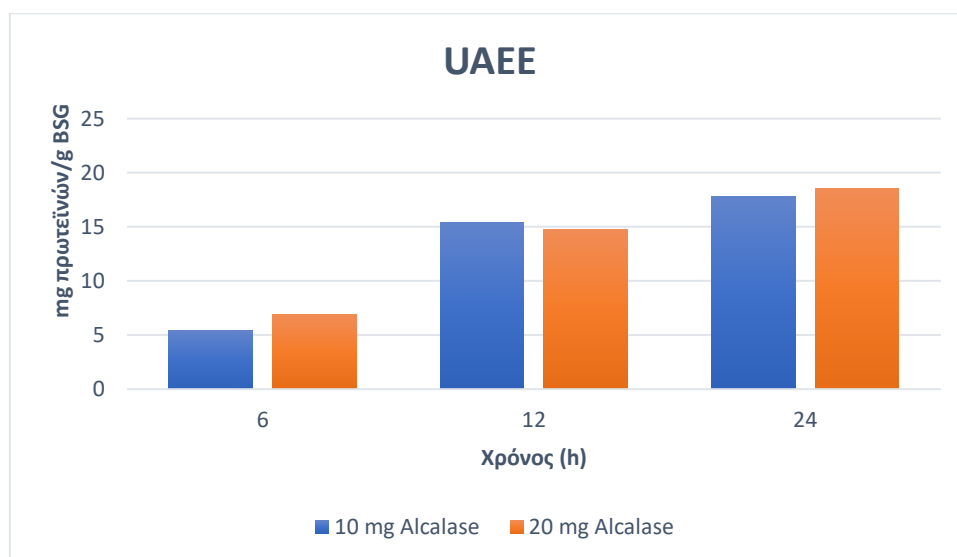
Αξιολογώντας συνολικά πλέον τα αποτελέσματα που εξάγονται για τις εκχυλίσεις που χρησιμοποιείται ο διαλύτης Methanol/NaOH (45:55), παρατηρείται πως οι εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους, πέραν από το γεγονός ότι δεν εξασφαλίζουν μεγαλύτερες αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση σε σύγκριση με τις συμβατικές, επιπλέον δε συμβάλλουν ούτε και στην αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου που λαμβάνεται ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης. Εκτός των παραπάνω αποδεικνύεται πως καμία από τις δύο αναλογίες στερεής βιομάζας διαλύτη, δεν παρουσιάζει ούτε πλουσιότερο παραγόμενο εκχύλισμα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, με μοναδική περίπτωση πειράματος το UEC001 του οποίου η περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος πλησιάζει την αντίστοιχη της

συμβατικής εκχύλισης αναλογίας 1:10. Σημειώνεται λοιπόν πως τα πειράματα με διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους, δεν παρουσιάζουν επιτυχία προκειμένου να αντικατασταθεί η χρήση της συμβατικής μεθόδου εκχύλισης. Κατά παρόμοιο τρόπο με το διαλύτη Ethanol/NaOH φαίνεται να επηρεάζει η παρουσία της μεθανόλης για το διαλύτη Methanol/ NaOH (45:55) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης.

6.3 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG για τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με ένζυμα

Στο παρόν πεδίο εξετάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση των πρωτεϊνικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με ένζυμα. Στα διαγράμματα παρακάτω απεικονίζονται οι περιεκτικότητες σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο για του τρεις χρόνους εκχύλισης που μελετήθηκαν και για τη χρήση προεπεξεργασμένων εξαντλημένων σπόρων κριθαριού και σπόρων που δεν έχουν υποστεί προηγουμένως επεξεργασία με τη χρήση υπερήχων και για τις δύο συγκεντρώσεις ενζύμου που μελετώνται.

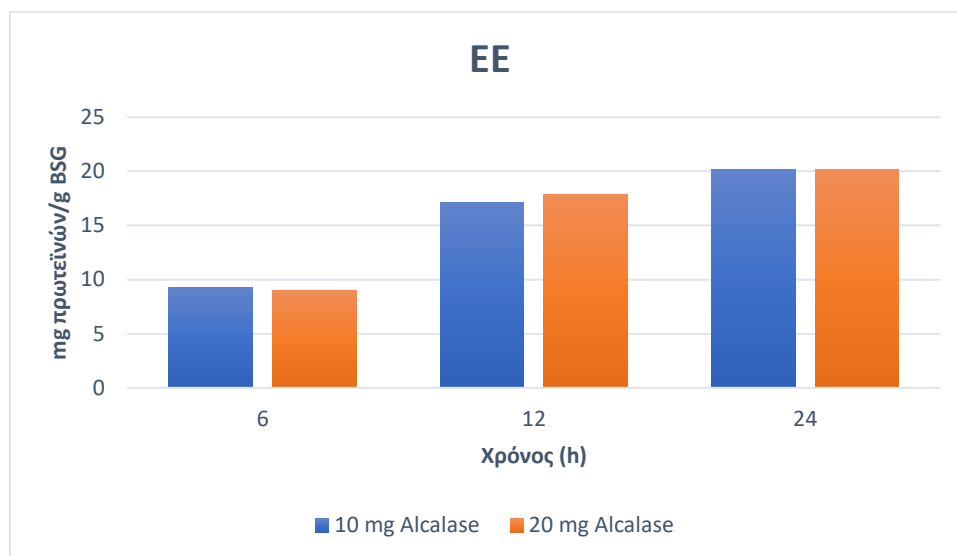
Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα και χρήση BSG που έχουν υποστεί κατεργασία με χρήση υπερήχων.



Διάγραμμα 8. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG της EAE για χρήση BSG μετά από επεξεργασία με χρήση υπερήχων

Από το παρόν διάγραμμα παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης οδηγεί σε αύξηση στην περιεκτικότητα πρωτεϊνικού περιεχομένου που λαμβάνεται ανά γραμμάριο επεξεργασμένων BSG που χρησιμοποιήθηκαν και για τις δύο συγκεντρώσεις ενζύμου. Οι εικοσιτετράωρες εκχυλίσεις φαίνεται πως παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG η οποία όμως δεν είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνη των 12 ωρών. Όσον αφορά στην επίδραση του παράγοντα της συγκέντρωσης του ενζύμου, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση αλκαλάσης οδηγεί σε καλύτερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο με τη μέγιστη τιμή να διαμορφώνεται στα 18,53 mg πρωτεΐνης/g BSG για 24 ώρες εκχύλισης, οποία όμως δεν διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την χαμηλότερη συγκέντρωση.

Στο Διάγραμμα 9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμο και χρήση BSG που δεν έχουν υποστεί κατεργασία με χρήση υπερήχων.



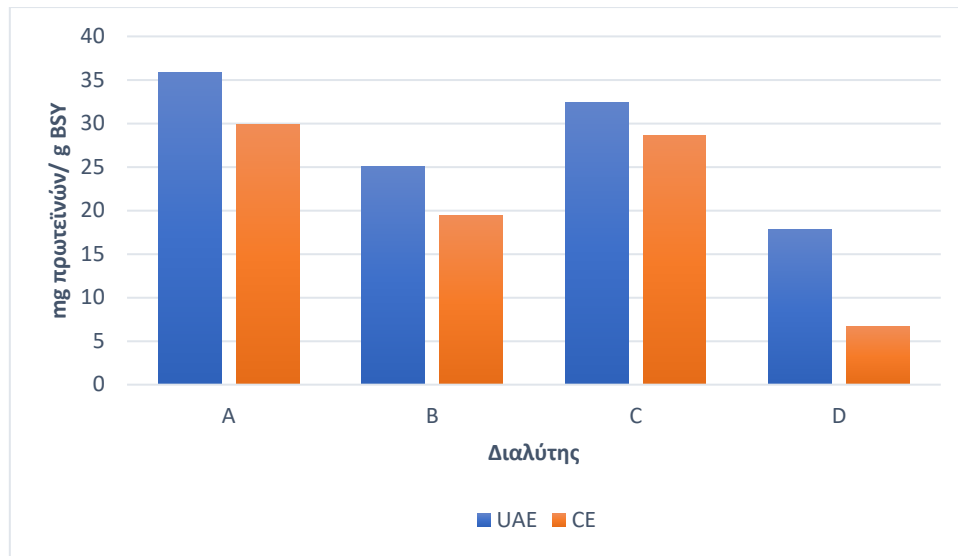
Διάγραμμα 9. Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG της EAE για χρήση BSG χωρίς επεξεργασία με χρήση υπερήχων

Ομοίως και στην περίπτωση των ακατέργαστων BSG η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης οδηγεί στην αύξηση της περιεκτικότητας του πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο BSG με την εικοσιτετράωρη εκχύλιση να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόδοση και να διαμορφώνεται στην τιμή των 20,15 mg πρωτεΐνης/g BSG και για τις δύο συγκεντρώσεις αλκαλάσης. Επίσης, παρατηρείται πως στη δωδεκάωρη εκχύλιση η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σχεδόν διπλασιάζεται σε σχέση με την εξάωρη.

Αξιολογώντας τα δεδομένα των δύο παραπάνω διαγραμμάτων γίνεται αντιληπτό πως η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης συμβάλλει θετικά στην εκχύλιση των πρωτεϊνών γεγονός το οποίο συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. [54] Επίσης, παρατηρείται πως για κάθε χρόνο εκχύλισης η χρήση των κατεργασμένων BSG με τη βοήθεια υπερήχων, οδηγεί σε μικρότερες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, γεγονός το οποίο αντιβαίνει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [54] και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης προκειμένου να εξακριβωθούν οι αιτίες για το αποτέλεσμα που προκύπτει. Επιπλέον γίνεται αντιληπτό πως η αύξηση της συγκέντρωσης της αλκαλάσης στα 20 mg δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στις αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως η συγκέντρωση της αλκαλάσης στα 10 mg είναι αρκετή ώστε να παραληφθεί σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης για κάθε χρόνο εκχύλισης.

6.4 Απόδοση πρωτεϊνικού περιεχομένου για τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για τη BSY

Στο παρόν πεδίο αξιολογούνται τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων που διενεργήθηκαν για τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς για κάθε διαφορετικό διαλύτη και κάθε διαφορετική μέθοδο εκχύλισης.



Διάγραμμα 10. Απόδοση πρωτεϊνικού ανά γραμμάριο BSY συμβατικών εκχυλίσεων και UAE

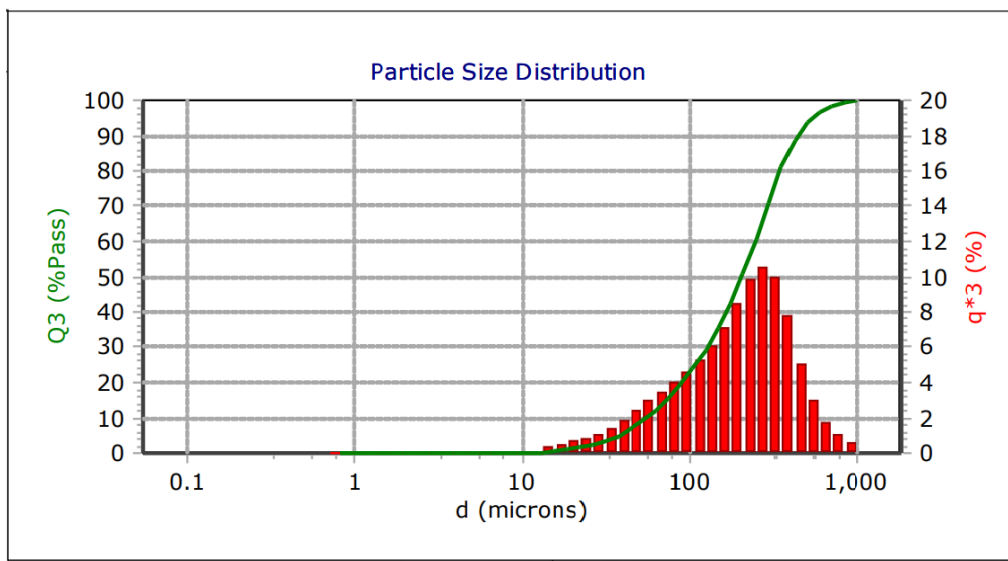
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 10 παρατηρείται πως και στους τέσσερις διαλύτες που μελετώνται η συμβατική εκχύλιση οδηγεί σε μικρότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSY, σε σχέση με την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στην εξάντληση της βιομάζας η οποία προκύπτει λόγω του υψηλού χρόνου κατεργασίας (24 ώρες) και οδηγεί σε υποβάθμιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Για χρήση του διαλύτη NaOH 0,1 M παρατηρείται πως λαμβάνεται η μεγαλύτερη απόδοση σε πρωτεΐνες ανά γραμμάριο BSY με την τιμή αυτή να διαμορφώνεται στα 35,84 mg πρωτεΐνης/ g BSY. Η αμέσως μεγαλύτερη απόδοση παρατηρείται για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) με την τιμή του πρωτεϊνικού περιεχομένου να φτάνει τα 32,39 mg πρωτεΐνης/ g BSY. Ακολουθεί ως αμέσως μεγαλύτερη περιεκτικότητα αυτή της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) και τιμή 25,08 mg πρωτεΐνης /g BSY και η μικρότερη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο λαμβάνεται για τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με την τιμή να αγγίζει τα 17,78 mg πρωτεΐνης/g BSY. Συμπεραίνεται λοιπόν πως τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς, εμφανίζει ο διαλύτης NaOH 0,1 M, ενώ ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε και η μεθανόλη, αποτελώντας έναν πολλά υποσχόμενο διαλύτη για την απομόνωση των πρωτεϊνών από BSY.

6.5 Μετρήσεις Λειτουργικών Ιδιοτήτων

Για τις μετρήσεις των αναλύσεων των λειτουργικών ιδιοτήτων των ξηρών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιούνται τα δείγματα για κάθε διαλύτη που αποδεικνύονται πλουσιότερα σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG. Για το NaOH 0,1 M χρησιμοποιείται από τα δείγματα της συμβατικής εκχύλισης το δείγμα αναλογίας 1:20 και από τα δείγματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους, το δείγμα αναλογίας 1:20 για ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), χρησιμοποιούνται από τη συμβατική εκχύλιση το δείγμα αναλογίας 1:10 και από την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους το δείγμα αναλογίας 1:10, ισχύος 450 W και χρόνου εκχύλισης 20 λεπτά. Τα πειράματα ίδιων συνθηκών επιλέγονται και για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55).

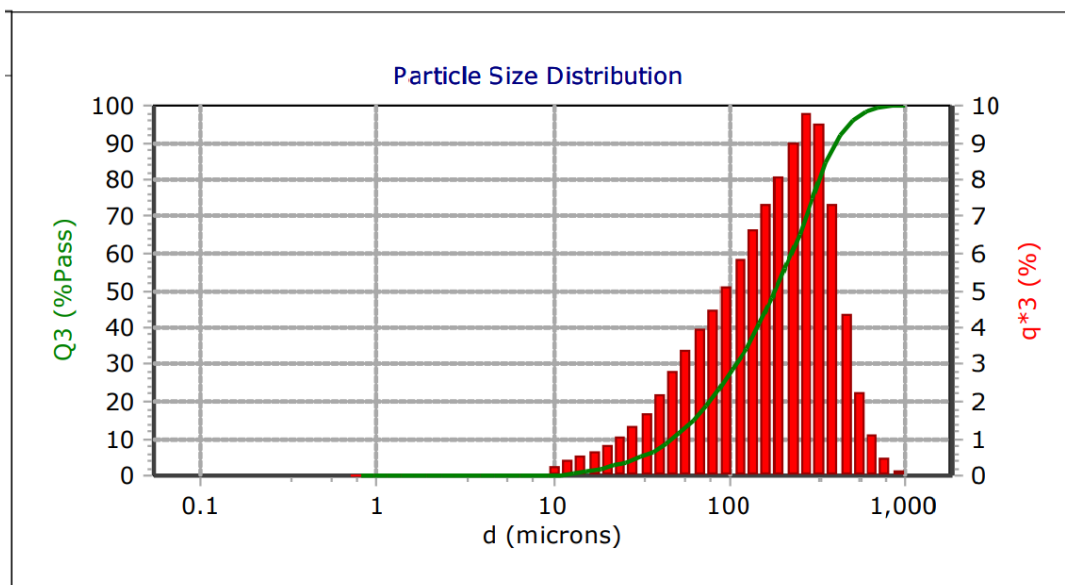
6.5.1 Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution)

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν ως αποτελέσματα και απεικονίζουν την κατανομή των μεγέθους των σωματιδίων για κάθε μέτρηση.



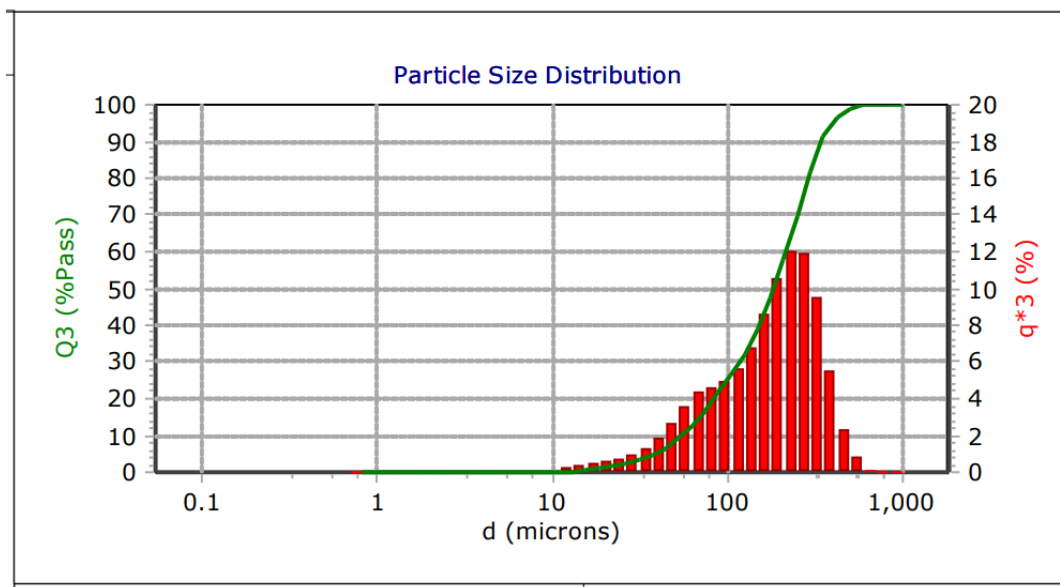
Διάγραμμα 11. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη NaOH 0,1 M

Στο Διάγραμμα 11 απεικονίζεται η διακύμανση του μεγέθους των σωματιδίων του ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που προκύπτει από τη συμβατική εκχύλιση του διαλύτη NaOH 0,1 M. Όπως απεικονίζεται από το διάγραμμα και προκύπτει και από την ανάλυση της μέτρησης όπως καταγράφηκε από το λογισμικό, ή μέση διάμετρος ανά όγκο των σωματιδίων στην παρούσα μέτρηση καταγράφηκε ίση με 231,6 μm .



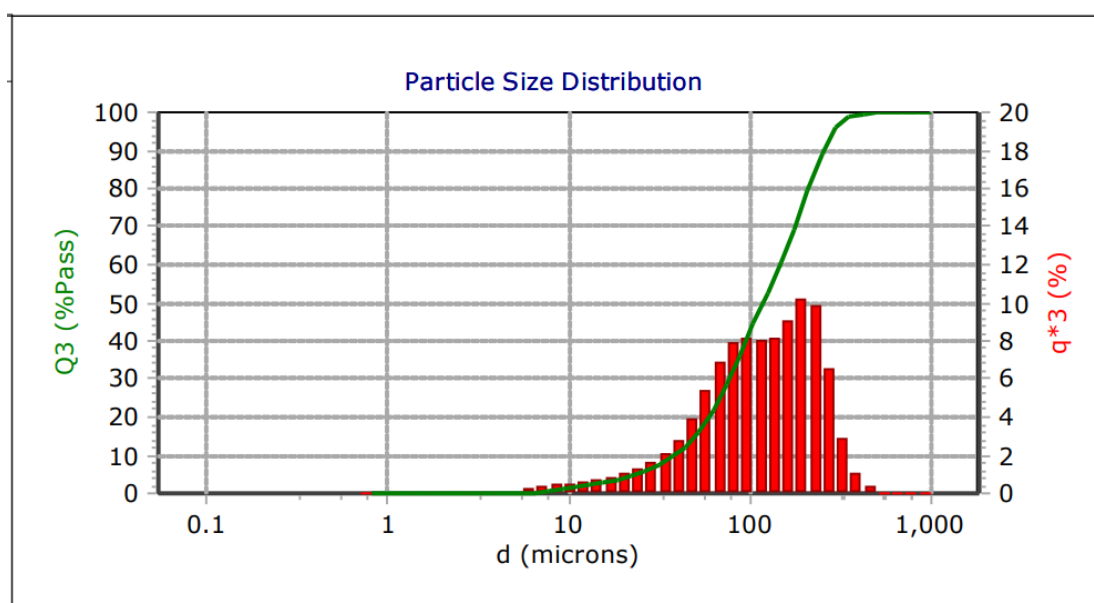
Διάγραμμα 12. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE με διαλύτη NaOH 0,1 M

Το Διάγραμμα 12 παρουσιάζει την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του ξηρού εκχυλίσματος της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη NaOH 0,1 M και η μέση τιμή της διαμέτρου του συνόλου των σωματιδίων προέκυψε ίση με 208,9 μm .



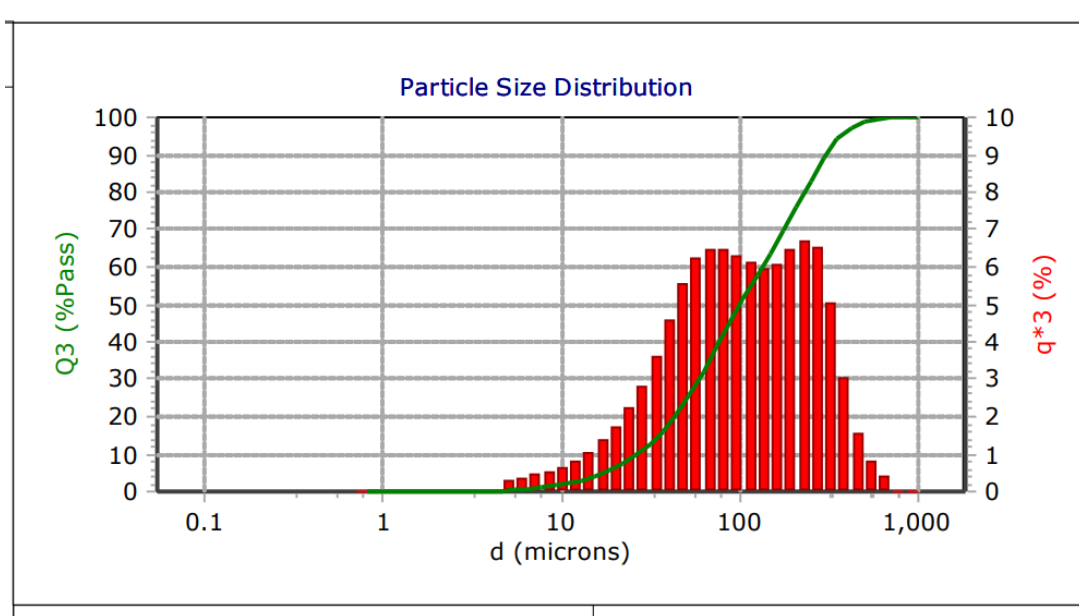
Διάγραμμα 13. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης με διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Η απεικόνιση της διακύμανσης του μεγέθους των σωματιδίων που προέρχονται από το ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55), παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13. Η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του συγκεκριμένου εκχυλίσματος προκύπτει ίση με 193,1 μm .



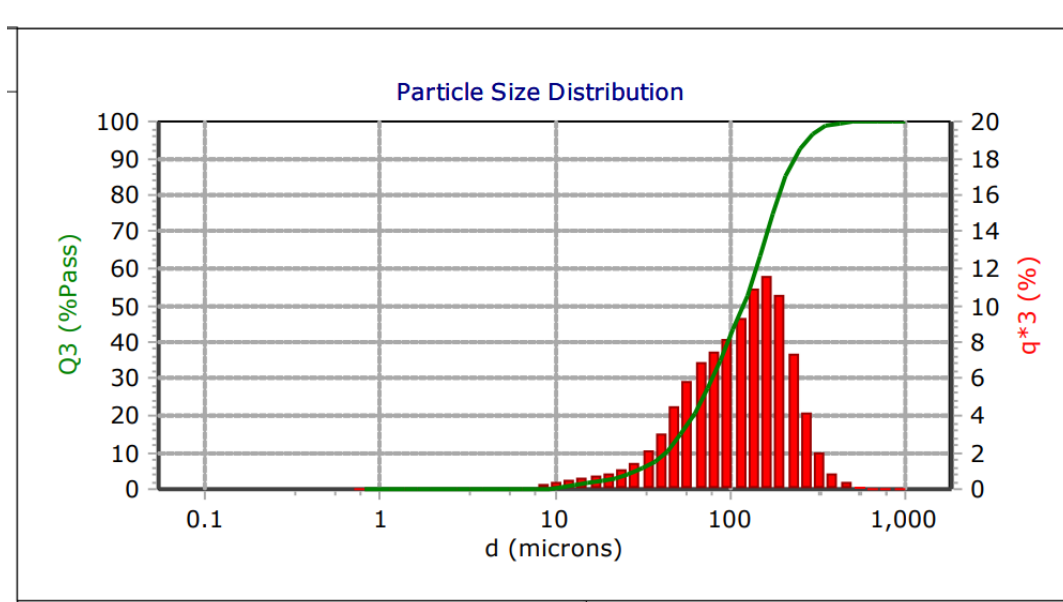
Διάγραμμα 14. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE με διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Το Διάγραμμα 14 παρουσιάζει την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55). Η μέση διάμετρος των σωματιδίων του παρόντος εκχυλίσματος προκύπτει ίση με 135,3 μm .



Διάγραμμα 15. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων συμβατικής εκχύλισης για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Στο Διάγραμμα 15 απεικονίζεται η διακύμανση της διαμέτρου των σωματιδίων της σκόνης ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της συμβατικής εκχύλισης για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) και απεικονίζεται ίση με 139,1 μm .



Διάγραμμα 16. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων UAE για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Η απεικόνιση της διακύμανσης του μεγέθους των σωματιδίων που προέρχονται από το ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55). Η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του συγκεκριμένου εκχυλίσματος προκύπτει ίση με 130,3 μm.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων όπου απεικονίζεται η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων των ξηρών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για κάθε διαλύτη, παρατηρείται πως και στις τρεις περιπτώσεις διαλύτη, τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους, παρουσιάζουν μικρότερη μέση διάμετρο ανά τον όγκο των σωματιδίων σε σχέση με τα αντίστοιχα των συμβατικών εκχυλίσεων. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται εξαιτίας της κατεργασίας με υψηλές τιμές ισχύος για τα συγκεκριμένα δείγματα. Χαρακτηριστικά, έχει παρατηρηθεί πως η κατεργασία δειγμάτων για εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους σε υψηλές τιμές ισχύος και για μεγαλύτερους χρόνους οδηγεί στη μείωση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων, καθώς αυξάνεται η επίδραση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης και των μικροδονήσεων που αυτοί προκαλούν. Κατά αυτόν τον τρόπο λοιπόν προκύπτουν περισσότερα σωματίδια μικρότερου μεγέθους σε σχέση με την κατεργασία δειγμάτων σε μικρότερες τιμές ισχύος υπερήχων. [58]

6.5.2 Μέτρηση Ικανότητας Συγκράτησης Νερού και Ελαίου (Water and Oil Absorption Capacity)

Στο παρόν πεδίο εξετάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου από τα ξηρά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα για τις συμβατικές εκχυλίσεις και τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για κάθε διαλύτη ξεχωριστά.

Πίνακας 11. Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη NaOH 0,1 M

NaOH			
WAC (g/g)		OAC (g/g)	
CE	3,46	CE	6,41
UAE	5,41	UAE	-

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 11 παρατηρείται πως η ικανότητα συγκράτησης νερού από το εκχύλισμα που προέρχεται από την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη για το εκχύλισμα προερχόμενο από τη συμβατική εκχύλιση. Αντίστοιχα, όσον αφορά στο έλαιο παρατηρείται πως συγκρατάται ολόκληρη η ποσότητα ελαίου που προστίθεται και είναι αδύνατη η μέτρησή της διαφοράς μάζας του ελαίου μετά τη φυγοκέντρηση.

Πίνακας 12. Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Ethanol/NaOH (45:55)			
WAC (g/g)		OAC (g/g)	
CE	2,83	CE	4,12
UAE	3,78	UAE	6,89

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55). Παρατηρείται πως το εκχύλισμα που προέρχεται από την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάζει μεγαλύτερη

ικανότητα συγκρότησης νερού και ελαίου σε σχέση με το εκχύλισμα που προέρχεται από τη συμβατική εκχύλιση.

Πίνακας 13. ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Methanol/NaOH (45:55)			
WAC (g/g)		OAC (g/g)	
CE	1,81	CE	2,91
UAE	3,13	UAE	4,48

Ο Πίνακας 13 περιλαμβάνει τις τιμές που ποσοτικοποιούν την ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου από το εκχύλισμα που προέρχεται από τις εκχυλίσεις με διαλύτη Methanol/NaOH (45:55). Και στην περίπτωση του συγκεκριμένου διαλύτη παρατηρείται πως το εκχύλισμα της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους οδηγείται σε πιο βελτιωμένη ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου σε σχέση με το αντίστοιχο της συμβατικής εκχύλισης.

Συγκεντρωτικά παρατηρείται πως τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους παρουσιάζουν καλύτερη δυνατότητα συγκράτησης νερού και ελαίου σε σχέση με τα εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων γεγονός το οποίο δικαιολογείται από την επίδραση της τεχνολογίας υπερήχων στη δομή των πρωτεϊνών. Η ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου είναι δύο ιδιότητες που παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους. Η μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού οδηγεί στην αύξηση της ικανότητας συγκράτησης ελαίου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην έκθεση περισσότερων υδρόφοβων ομάδων λόγω της επίδρασης των υπερήχων και οδηγούν στη φυσική παγίδευση ελαίου από πρωτεϊνικά μόρια. Η αυξημένη ικανότητα συγκράτησης νερού, συμβάλλει στην πρόσδοση χυμώδους υφής στην πάχυνση του μέσου και στις ιδιότητες ιξώδους. Αντίστοιχα η ικανότητα συγκράτησης ελαίου οδηγεί στη διατήρηση γεύσεων και αρωμάτων σε υποκατάστατα κρέατος, σούπες και προϊόντα ζύμης. [58]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αναγκαιότητα κάλυψης των διατροφικών αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού σε πρωτεΐνες και οι σύγχρονες τάσεις της αγοράς για την υιοθέτηση ενός λιγότερο κρεατοφαγικού τρόπου ζωής, ενισχύει το ενδιαφέρον για μελέτη απομόνωσης πρωτεϊνών από εναλλακτικές πηγές όπως είναι τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας ζυθοποιίας που εμφανίζονται πλούσια σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

Στο παρόν πεδίο συνοψίζονται τα αποτελέσματα που εξάγονται από την επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων όπως καταγράφονται στο Κεφάλαιο 6.

Συμβατική εκχύλιση με διαλύτη NaOH 0,1 M

Αρχικά επιλέγεται η χρήση διαλύτη NaOH 0,1 M προκειμένου να γίνει εφικτή η απομόνωση πρωτεϊνών όπως είναι οι γλουτελίνες που εκχυλίζονται καλύτερα σε αλκαλικό περιβάλλον, όπως και αλβουμινών και γλοβουλινών που διαλύονται σε υδατικά συστήματα. Όσον αφορά στην εκχύλιση με χρήση διαλύτη το NaOH 0,1 M, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση εντοπίζεται για την αναλογία στερεής βιομάζας-διαλύτη 1:20 ($23,34\% \pm 0,89\%$) σε σχέση με την αναλογία 1:10. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και για την απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG ($60,52 \pm 2,53$), όμως φαίνεται πως ενώ η συγκεκριμένη αναλογία οδηγεί σε απομόνωση μεγαλύτερου πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά γραμμάριο ξηρής πρώτης ύλης, εντούτοις δεν οδηγεί στην ανάκτηση ενός πολύ πλουσιότερου πρωτεϊνικά εκχυλίσματος. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως η περαιτέρω αύξηση του NaOH 0,1 M στις συμβατικές εκχυλίσεις δεν οδηγεί σε πολύ υψηλότερη ανάκτηση πρωτεϊνών στο σύνολο του εκχυλίσματος.

Συμβατική εκχύλιση με διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Επιπλέον επιλέγεται η χρήση διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) ώστε να γίνει δυνατή η απομόνωση πρωτεϊνών όπως είναι οι ορδεΐνες που ανακτώνται με χρήση αλκοολών και ταυτόχρονα να ενισχυθεί η αλκαλική φάση του διαλύτη προκειμένου να απομονωθεί πλέον το σύνολο των πρωτεϊνών που περιέχονται στα BSG. Όσον αφορά στις αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση για το συγκεκριμένο διαλύτη, παρατηρείται πως η μεγαλύτερη αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη, οδηγεί στην απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλίσματος σε σχέση με την αναλογία 1:10 όμως χωρίς να παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά, συνεπώς εξάγεται το συμπέρασμα πως για την εξοικονόμηση χρήσης διαλύτη, είναι προτιμότερη η εφαρμογή της αναλογίας 1:10. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τις αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο για το συγκεκριμένο διαλύτη ως προς την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο που εντοπίζεται ίσο με $208,82 \pm 8,55$ mg πρωτεϊνών/g ξηρού εκχυλίσματος.

Συμβατική εκχύλιση με διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Κατά παρόμοιο τρόπο επιλέγεται η χρήση του διαλύτη Methanol/NaOH (45:55) προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση μίας ακόμη αλκοόλης. Ως προς την απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση παρατηρείται πως η αναλογία 1:10 στερεής βιομάζας διαλύτη οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση ($12,72\% \pm 0,71\%$) και συνέβαλε στην απομόνωση $28,61 \pm 1,63$ mg πρωτεΐνης/g BSG και $224,98 \pm 0,31$ mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος.

Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους με διαλύτη NaOH 0,1 M

Όσον αφορά στις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη NaOH 0,1M παρατηρείται πως η αναλογία στερεής βιομάζας διαλύτη 1:20 οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερες

αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση γεγονός το οποίο οφείλεται στην αυξημένη παρουσία υδατικής φάσης που συμβάλλει θετικά στην επίδραση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης και αυξάνει τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον παρατηρείται πως η απόδοση της εκχύλισης σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση δεν αυξάνεται σημαντικά για ισχύ υπερήχων υψηλότερη από την ισχύ των 450 W, αντίθετα η επίδραση της ισχύος των υπερήχων ως προς την απομόνωση πρωτεϊνικού περιεχομένου, έχει θετική επίδραση με τη βέλτιστη συνθήκη για το συγκεκριμένο διαλύτη να προκύπτει για ισχύ υπερήχων 750 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά και η περιεκτικότητα σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο BSG να διαμορφώνεται στην τιμή $61,39 \pm 5,21$ και την περιεκτικότητα σε mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος στην τιμή $326,74 \pm 6,06$, καταδεικνύοντας την ως μια εναλλακτική για την απομόνωση πρωτεΐνης από τα BSG έναντι της αντίστοιχης συμβατικής εκχύλισης, μειώνοντας κατά πολύ το χρόνο κατεργασίας και τις ενεργειακές απαιτήσεις. Συνολικά λοιπόν προκύπτει το συμπέρασμα πως η αύξηση της ισχύος των υπερήχων έχει νόημα και επιφέρει επιτυχημένα αποτελέσματα στην απόδοση της εκχύλισης χάρη στην ενίσχυση των ακουστικών κυμάτων και της επίδρασης του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης.

Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55)

Μελετώντας τις εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους για το διαλύτη Ethanol/NaOH (45:55) παρατηρείται πως δεν εξάγεται σαφές συμπέρασμα σε σχέση με την επίδραση της αναλογίας στερεής βιομάζας διαλύτη στην απόδοση των εκχυλίσεων σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση. Ωστόσο γίνεται σαφές πως η αναλογία 1:20 παρουσιάζει χαμηλότερες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSG οι οποίες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Ως προς την απομόνωση πρωτεϊνών όμως ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος, η αναλογία 1:10 εμφανίζει βελτιωμένα αποτελέσματα. Επιπλέον παρατηρείται πως οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση συνολικά παρουσιάζουν πτωτική πορεία σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση γεγονός το οποίο οφείλεται στην επίδραση της παρουσίας αιθανόλης στην πολικότητα του συστήματος που επιφέρει μείωση στην επίδραση του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης. Ωστόσο αξιολογώντας μεμονωμένα τα αποτελέσματα της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το συγκεκριμένο διαλύτη, εξάγεται η γενική παρατήρηση της αύξησης της απόδοσης σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο με την αύξηση της ισχύος των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης. Παρατηρείται όμως πως η αύξηση των υπερήχων πέραν των 450 W δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές. Επιπλέον παρατηρείται πως η αναλογία 1:10 οδηγεί σχεδόν για όλες τις συνθήκες των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους σε αποτελέσματα που προσεγγίζουν τις αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος σε σχέση με τις συμβατικές εκχυλίσεις. Η βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης που παρουσιάζει αποτελέσματα που πλησιάζουν τις τιμές της συμβατικής εκχύλισης ($240,36 \pm 42,45$ mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος και $20,14 \pm 2,25$ mg πρωτεΐνης/g BSG) εντοπίζεται για τις συνθήκες ισχύος 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά και μπορεί να αντικαταστήσει τη συμβατική εκχύλιση.

Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους για διαλύτη Methanol/NaOH (45:55)

Τα αποτελέσματα της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους για το διαλύτη Methanol/NaOH (45:55), δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικές αποδόσεις ούτε ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος αλλά ούτε και ως προς το πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Από το σύνολο των συνθηκών που μελετάται προκύπτει πως η συνθήκη για αναλογία 1:10 και ισχύ υπερήχων 450 W και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά, προσεγγίζει τις τιμές της συμβατικής εκχύλισης για το συγκεκριμένο διαλύτη με αυτές να διαμορφώνονται σε $203,75 \pm 20,75$ mg πρωτεΐνης/g ξηρού εκχυλίσματος και $16,89 \pm 0,97$ mg πρωτεΐνης/g BSG.

Εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες με ένζυμο

Όσον αφορά στις εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες με ένζυμο, παρατηρείται πως η επίδραση του χρόνου της εκχύλισης οδηγεί σε σημαντική αύξηση της απομόνωσης πρωτεϊνών από τα BSG ιδιαίτερα για χρόνο εκχύλισης 12 ώρες σε σχέση με την εκχύλιση των 6 ωρών, όπως παρατηρείται και βιβλιογραφικά. Η μέγιστη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο παρατηρείται στην εικοσιτετράωρη εκχύλιση και διαμορφώνεται στην τιμή 20,15 mg πρωτεΐνης/g BSG. Επιπλέον παρατηρείται πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου δε συμβάλλει θετικά στην απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεϊνών επομένως η συγκέντρωση 10mg αλκαλάσης παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Εκτός των παραπάνω συμπεραίνεται πως η προκατεργασία των BSG με χρήση υπερήχων παρουσιάζει χαμηλότερες αποδόσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Εκχυλίσσεις πρωτεϊνών από υπολείμματα εξάντλημένη μαγιάς

Οι εκχυλίσσεις των υπολειμμάτων μαγιάς, οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι συμβατικές εκχυλίσσεις επιφέρουν μειωμένα αποτελέσματα σε σχέση με τις υποβοηθούμενες με υπερήχους εξαιτίας της εξάντλησης του πρωτεϊνικού περιεχομένου για κατεργασία 24 ωρών. Ως προς τη χρήση διαλυτών, ο διαλύτης NaOH 0,1 M παρουσιάζει τη μέγιστη απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά γραμμάριο BSY και διαμορφώνεται στην τιμή 35,84 mg πρωτεΐνης/ g BSY. Ο αμέσως πιο αποδοτικός διαλύτης αποδεικνύεται ο Methanol/NaOH (45:55) και οδηγεί σε απομόνωση 32,39 mg πρωτεΐνης /g BSY.

Μελέτη λειτουργικών ιδιοτήτων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Τέλος τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους, παρουσιάζουν βελτιωμένες λειτουργικές ιδιότητες και συγκεκριμένα διακύμανσης μεγέθους σωματιδίων και ικανότητας συγκράτησης νερού και ελαίου σε σχέση με τα εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων, γεγονός που τα καθιστά αξιοποιήσιμα στο πεδίο της βιομηχανίας τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μία πρώτη απόπειρα προσέγγισης των παραπροϊόντων της βιομηχανίας ζυθοποιίας. Όπως διαπιστώνεται τόσο οι εξαντλημένοι σπόροι κριθαριού όπως και τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς είναι χρήσιμες πρώτες ύλες πλούσιες σε πρωτεΐνες και άλλα χρήσιμα συστατικά για αυτό και χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

- Αρχικά είναι χρήσιμη η μελέτη της επίδρασης φιλικών και εδωδιμων διαλυτών στην απομόνωση πρωτεϊνών από τους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού. Πιο συγκεκριμένα, είναι σκόπιμο να μελετηθεί η χρήση διαλυτών που είναι φιλικό προς το περιβάλλον, όπως είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και μπορούν να ενταχθούν σε συστήματα τροφίμων
- Σημαντική είναι επίσης η αξιολόγηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των απομονωμένων εκχυλισμάτων της παρούσας μελέτης με τη μέθοδο Kjeldahl ώστε να εξακριβωθεί εάν οι διαλύτες Ethanol/NaOH (45:55) και Methanol/NaOH (45:55) οδηγούν πράγματι σε απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στους εξαντλημένους σπόρους κριθαριού
- Χρήσιμος είναι επίσης και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που προκύπτουν ως προς τα περιεχόμενα αμινοξέα και τις περιεχόμενες πρωτεΐνες
- Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένος πειραματικός σχεδιασμός ως προς την εκχύλιση πρωτεϊνών από τα υπολείμματα της εξαντλημένης μαγιάς, καθώς επίσης και η ανάπτυξη πρωτοκόλλου σχετικά με την απομόνωση των πρωτεϊνών περιλαμβάνοντας τα στάδια της εκχύλισης, της καταβύθισης και της παραλαβής των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων
- Επιπλέον είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένος πειραματικός σχεδιασμός στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα και να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου εκχύλισης προκειμένου να αναπτυχθεί το κινητικό μοντέλο της εκχύλισης και της συγκέντρωσης αλκαλάσης και για μικρότερες συγκεντρώσεις ως προς τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία
- Χρήσιμη είναι και η μελέτη κι άλλων εναλλακτικών πράσινων τεχνικών εκχύλισης όπως είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και η υγρή εκχύλιση υπό υψηλή πίεση
- Τέλος είναι σκόπιμο να πραγματοποιηθεί ανάλυση κύκλου ζωής προκειμένου να αποτιμηθεί η περιβαλλοντική επίδραση των παραπροϊόντων από το στάδιο παραγωγής τους μέχρι την τελική τους αξιοποίηση

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Morgan, K. (2009). Feeding the City: The Challenge of Urban Food Planning. *International Planning Studies*, 14(4) pp.341–348
- [2] Melikoglu, M., Lin, C. and Webb, C. (2013). Analysing global food waste problem: pinpointing the facts and estimating the energy content. *Open Engineering*, 3(2) pp.157-164.
- [3] Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Kumar, G., Gunasekaran, M. and Rajesh Banu, J. (2020). Introduction: sources and characterization of food waste and food industry wastes. *Food Waste to Valuable Resources*, pp.1–13.
- [4] Thi, N.B.D., Kumar, G. and Lin, C.-Y. (2015). An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective. *Journal of Environmental Management*, 157, pp.220–229.
- [5] European Commission. (2020). *Brief on food waste in the European Union*.
- [6] Papargyropoulou, E., Lozano, R., K. Steinberger, J., Wright, N. and Ujang, Z. bin (2014). The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production*, 76, pp.106–115.
- [7] Lenucci, M.S., Durante, M., Anna, M., Dalessandro, G. and Piro, G. (2013). Possible Use of the Carbohydrates Present in Tomato Pomace and in Byproducts of the Supercritical Carbon Dioxide Lycopene Extraction Process as Biomass for Bioethanol Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), pp.3683–3692.
- [8] Schanes, K., Dobernig, K. and Gözet, B. (2018). Food waste matters – A systematic review of household food waste practices and their policy implications. *Journal of Cleaner Production*, 182, pp.978–991.
- [9] Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C. and Kartal, C. (2015). Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry. *Food Waste Recovery*, pp.3–23.
- [10] Ravindran, R. and Jaiswal, A.K. (2016). Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), pp.58–69.
- [11] Oreopoulou, V and Tzia, C. (2007) Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibres, antioxidants and colorants, *in Utilization of by-products and treatment of waste in the Food Industry*, Springer Science, New York.
- [12] Pires, E. and Brányik, T. (2015). An Overview of the Brewing Process. *Biochemistry of Beer Fermentation, SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology*, pp.1–9.
- [13] Mosher, M. and Trantham, K. (2016). Overview of the Brewing Process. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*, pp.95–123.

- [14] Briggs, D. E., Hough, J. S., Stevens, R., Young, T. W., *Malting and brewing science, Volume 1: Malt and sweet wort*, 2nd ed., London: Chapman & Hall, 1981.
- [15] Mussatto, S.I., Dragone, G. and Roberto, I.C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), pp.1–14.
- [16] Gupta, M., Abu-Ghannam, N. and Gallagher, E. (2010). Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), pp.318–328.
- [17] Mosher, M. and Trantham, K. (2016). The “Food” for the Brew. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*, pp.125–156.
- [18] Milling and Mashing. (2014). *The Chemistry of Beer*, John Wiley & Sons, pp.130–147.
- [19] Wort Separation and Boiling. (2014). *The Chemistry of Beer*, John Wiley & Sons, pp.148–159.
- [20] Mosher, M. and Trantham, K. (2016). Wort Boiling. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*, pp.227–261.
- [21] Π. Στεφανιδάκης, <https://www.beeroskopio.com/>
- [22] Lynch, K.M., Steffen, E.J. and Arendt, E.K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), pp.553–568.
- [23] Osamu Kanauchi, Keiichi Mitsuyama and Yoshio Araki (2001). *Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis* 59, pp.59-62.
- [24] Santos, M., Jiménez, J.J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. and del Nozal, M.J. (2003). Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry*, 80(1), pp.17–21.
- [25] Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), pp.2453–2460.
- [26] Charilaos Xiros, Evangelos Topakas, Petros Katapodis and Christakopoulos, P. (2008). *Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by Neurospora crassa*. 99(13):5427-35.
- [27] Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, J.A. and Mussatto, S.I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, pp.152–158.
- [28] Connolly, A., Piggott, C.O. and FitzGerald, R.J. (2013). Characterisation of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), pp.1670–1681.

- [29] Waters, D.M., Jacob, F., Titze, J., Arendt, E.K. and Zannini, E. (2012). Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research and Technology*, 235(5), pp.767–778.
- [30] Mussatto, S.I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), pp.1264–1275.
- [31] Jacob, F.F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M. and Methner, F.-J. (2019). Spent Yeast from Brewing Processes: A Biodiverse Starting Material for Yeast Extract Production. *Fermentation*, 5(2), p.51.
- [32] Vieira, E.F., Carvalho, J., Pinto, E., Cunha, S., Almeida, A.A. and Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, pp.44–51.
- [33] Podpora, B., Świdorski, F., Sadowska, A., Rakowska, R. and Wasiak-Zys, G. (2016). Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(No. 6), pp.554–563.
- [34] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Vieira, E. and Tavarela, J.G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), pp.77–84.
- [35] Mussatto, S.I. (2009). *Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products*. pp 313-326.
- [36] Barbosa-Canovas, G.V., Vega-Mercado, H., (1996). *Dehydration of Foods*. International Thomson Publishing (ITP), New York, USA.
- [37] Bonazzi, C., Dumoulin, E., (2011). Quality changes in food materials as influenced by drying processes, *Modern Drying Technology, Volume 3: Product Quality and Formulation*, Tsotsas, E. and Mujumdar, A. S. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1-20.
- [38] Ταούκης, Π., Ωραιοπούλου, Β., (2009). Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα, σελ. 293 – 330
- [39] Marques, L.G., Silveira, A.M., Freire, J., (2006). Freeze-drying characteristics of tropical fruits. *Drying Technology* 24(4), 457-463.
- [40] ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S. and FESSI, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), pp.1688–1713.
- [41] Soham Shukla (2011). FREEZE DRYING PROCESS: A REVIEW. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, pp. 3061-3068.
- [42] Ταούκης, Π., Ωραιοπούλου, Β., (2009). Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα, σελ. 358-360.

- [43] Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M.K., Satankar, V., Bhoite, A.G., Amarowicz, R., Kaur, C. and Kennedy, J.F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, p.106595.
- [44] Χανιώτη, Σ. (2019), Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης φυτικών λιπαρών και βιοδραστικών συστατικών τους, (Διδακτορική Διατριβή), Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα
- [45] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S. and Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, pp.540–560.
- [46] Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426–436.
- [47] Romdhane, M. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87(1), pp.11–19.
- [48] Luque-García J.L. and Luque de Castro, M.D. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), pp.41–47.
- [49] Puri, M., Sharma, D. and Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), pp.37–44.
- [50] Nadar, S.S., Rao, P. and Rathod, V.K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, pp.309–330.
- [51] Qin, F., Johansen, A.Z. and Mussatto, S.I. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer’s spent grains. *Industrial Crops and Products*, 125, pp.443–453.
- [52] Cookman, D.J. and Glatz, C.E. (2009). Extraction of protein from distiller’s grain. *Bioresource Technology*, 100(6), pp.2012–2017.
- [53] Li, W., Yang, H., Coldea, T.E. and Zhao, H. (2021). Modification of structural and functional characteristics of brewer’s spent grain protein by ultrasound assisted extraction. *LWT*, 139, p.110582.
- [54] Yu, D., Sun, Y., Wang, W., O’Keefe, S.F., Neilson, A.P., Feng, H., Wang, Z. and Huang, H. (2019). Recovery of protein hydrolysates from brewer’s spent grain using enzyme and ultrasonication. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), pp.357–368.
- [55] Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D. and Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), pp.1051–1059.
- [56] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.

[57] Vieira, E., Brandão, T. and Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2013). Evaluation of Brewer's Spent Yeast To Produce Flavor Enhancer Nucleotides: Influence of Serial Repitching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), pp.8724–8729.

[58] Rahman, M.M. and Lamsal, B.P. (2021). Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), pp.1457–1480.

[59] Chatzifragkou, A., Prabhakumari, P.C., Kosik, O., Lovegrove, A., Shewry, P.R. and Charalampopoulos, D. (2016). Extractability and characteristics of proteins deriving from wheat DDGS. *Food Chemistry*, 198, pp.12–19.

[60] Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J. and Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*, 82(10), pp.2232–2242.

[61] Panda, D. and Manickam, S. (2019). Cavitation Technology—The Future of Greener Extraction Method: A Review on the Extraction of Natural Products and Process Intensification Mechanism and Perspectives. *Applied Sciences*, 9(4), p.766.