



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

*ΤΟΜΕΑΣ II: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ &  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

**ΤΙΤΛΟΣ**

**Απομόνωση πρωτεϊνών και φυτικών ινών από ρεβίθι χρησιμοποιώντας  
μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον**

**Διπλωματική Εργασία**

**Δημήτριος Μαυροπάνος**

ΕΠΙΒΛΕΨΗ

**ΚΡΟΚΙΔΑ Μ.**

Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2021



Στους γονείς μου,  
Σωτήρη και Φωτεινή και τον Μιχάλη



## Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Μαγδαληνής Κροκίδα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα, η οποία μου έδειξε εμπιστοσύνη για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας. Έπειτα, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδάκτορα Σοφία Παπαδάκη, η οποία με καθοδήγησε πλήρως κατά την διάρκεια της προσπάθειάς μου και με βοήθησε να νιώσω απόλυτα άνετα κατά την μεταξύ μας συνεργασία.

Στην συνέχεια, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω έναν έναν ξεχωριστά τους ανθρώπους του εργαστηρίου, καθώς όλοι αφιέρωσαν χρόνο και προσπάθεια για να μου προσφέρουν βοήθεια στα προβλήματα που συνάντησα κατά την συνολική διάρκεια της προσπάθειάς μου και ιδίως την υποψήφια διδάκτορα Μαργαρίτα Παναγιωτοπούλου, της οποίας η βοήθεια ήταν πολύτιμη. Καθοριστική ήταν και η βοήθεια των συμφοιτητών μου, με τους οποίους η συνεργασία ήταν άψογη. Εύχομαι σε όλους υγεία, ευτυχία και την επίτευξη των προσωπικών τους στόχων.

Τέλος, θα ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τους φίλους μου.

## Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής μελετήθηκε η εκχύλιση πρωτεϊνών και γαλακτοολιγοσακχαριτών από ρεβίθι, ώστε να προκύψουν εκχυλίσματα που μπορούν να βρουν εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων.

Η υπέρμετρη κατανάλωση κρέατος και παραγώγων του σε συνδυασμό με την μη ελεγχόμενη αύξηση του πληθυσμού του πλανήτη έχουν οδηγήσει στην ολοένα και μεγαλύτερη επιδείνωση των περιβαλλοντικών συνεπειών που συνδέονται με την βιομηχανία της κτηνοτροφίας. Η υπερβολική κατανάλωση ζωικών προϊόντων συνδέεται με έναν αριθμό παραγόντων που θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία, ενώ διερευνάται και η άμεση συσχέτισή της με σοβαρά προβλήματα υγείας.

Για τους παραπάνω λόγους, η αγορά, καθώς και οι ερευνητές κινούνται όλο και περισσότερο γύρω από την υποκατάσταση του κρέατος από εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης. Το ρεβίθι είναι μια σημαντική εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών, η οποία παρουσιάζει αρκετά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, καθώς παρουσιάζει επίσης περιεχόμενο πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά, όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που δρουν ως προβιοτικά.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εκχύλιση πρωτεϊνών από ρεβίθι, τόσο με την συμβατική μέθοδο της αλκαλικής εκχύλισης αλλά και η εκχύλιση με την βοήθεια της τεχνικής υψηλής ενέργειας των υπερήχων. Κατά την διάρκεια των εκχυλίσεων δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί των παραμέτρων που αφορούν τις διεργασίες (αναλογία βιομάζας προς διαλύτη, χρονικό διάστημα εκχύλισης, ισχύς υπερήχων) και διερευνήθηκε η επίδραση τους στην απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος. Ακολούθησαν φυσικοχημικές μετρήσεις των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και ειδικότερα η ανάλυση διακύμανσης μεγέθους σωματιδίων, η μέτρηση της δυνατότητας κατακράτησης νερού και ελαίου και της διαλυτότητας πρωτεΐνης. Η χρήση υπερήχων αποδείχθηκε ευεργετική για την απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, αλλά και για τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ενώ ο βέλτιστος συνδυασμός παραμέτρων βρέθηκε για αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:12, χρόνο εκχύλισης 10 λεπτών και επιπέδων ισχύος 450 Watt.

Πραγματοποιήθηκαν, επιπλέον, εκχυλίσεις γαλακτοολιγοσακχαριτών τόσο με την συμβατική μέθοδο εκχύλισης στερεού υγρού, όσο και με την χρήση της τεχνικής υψηλής ενέργειας των μικροκυμάτων. Και σε αυτήν την περίπτωση δοκιμάστηκε η επίδραση των διαφορετικών συνδυασμών παραμέτρων εκχύλισης ( χρόνος, θερμοκρασία, είδος διαλύτη) τόσο σε ποιοτικό, όσο και σε ποσοτικό επίπεδο στο περιεχόμενο των εκχυλισμάτων. Η ποιοτική και η ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων έγινε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC). Ο βέλτιστος διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μίγμα αιθανόλης νερού 60:40 και το υψηλότερο περιεχόμενο σε GOS παρατηρήθηκε για εκχύλιση με επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας 250 Watt, για χρόνο εκχύλισης 20 λεπτών και θερμοκρασία 50 °C, με όλες τις εκχυλίσεις να γίνονται για αναλογία πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη 1:20

Λέξεις κλειδιά: ρεβίθι, εκχύλιση πρωτεϊνών, εκχύλιση γαλακτοολιγοσακχαριτών



## Abstract

The purpose of this diploma thesis is the extraction of proteins and galactooligosaccharides (GOS) from chickpea seeds, in order to obtain extracts that can be used in the food industry.

Excessive consumption of meat and its derivatives combined with the uncontrolled growth of the world's population have led to an increasing deterioration of the environmental impacts associated with the livestock industry. Excessive consumption of animal products is associated with a number of factors that affect human health, while its direct association with serious health problems is being investigated.

For the above reasons, the food market as well as researchers are increasingly putting effort in finding new ways to substitute meat by alternative sources such as plant based protein. Chickpeas are an important alternative source of protein, which shows a number of benefits for human health, as it appears to contain a large amount of bioactive compounds, such as galactooligosaccharides that act as prebiotic fibers.

Specifically, the protein extraction from chickpea seeds was tested using conventional alkaline extraction with and without ultrasonic treatment. During the extractions, different combinations of process parameters (biomass to solvent ratio, extraction time, ultrasound power) were tested according to their effect on the protein content of the extract. Some physical properties of the extracts and in particular the particle size distribution, water and oil holding capacity and protein solubility were also tested. The ultrasonic treatment proved to be beneficial for the amount of protein content of the extracts, but also for their physical properties, while the optimal conditions were solid to solvent ratio 1:12, 10 minutes extraction time and 450 Watt.

The second part of this diploma thesis is related to the extraction of galactooligosaccharides from chickpea seeds. GOS were extracted using both the conventional solid liquid extraction (SLE) method and the microwave assisted SLE technique. In this case, too, the effect of different conditions (time, temperature, type of solvent) was tested. The identification and quantification of GOS in the extracts was done using HPLC. The optimum solvent used was the 60:40 ethanol water mixture and the highest GOS content was observed for the extraction treated by 250 Watt microwave radiation, for 20 minutes of extraction time at 50 °C, while all extractions conducted with a solid to liquid ratio 1:20.

Keywords: chickpea, protein extraction, milk extraction oligosaccharides





## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract .....	7
Ευρετήριο εικόνων .....	12
Ευρετήριο πινάκων .....	13
Ευρετήριο διαγραμμάτων .....	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	16
Κεφάλαιο 1: Σύγχρονες τάσεις στην αγορά τροφίμων .....	17
1.1 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις κτηνοτροφίας.....	17
1.2 κατανάλωση ζωικών προϊόντων και υγεία .....	18
1.3 Εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών .....	20
1.3.α εναλλακτικές φυτικής προέλευσης.....	21
Κεφάλαιο 2: Εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών .....	23
2.1 Όσπρια.....	24
2.2 Ρεβίθι.....	28
2.2.α Παραγωγή .....	29
2.2.β περιεχόμενο ρεβιθιού και οφέλη για την υγεία.....	30
2.2.β.Ι Πρωτεϊνικό περιεχόμενο:.....	30
2.2.β.ΙΙ Περιεχόμενο σε υδατάνθρακες : .....	31
2.2.β.ΙΙ.α: GOS στους σπόρους ρεβιθιού .....	33
2.2.β.ΙΙΙ Περιεχόμενο σε φυτικές ίνες .....	35
2.2.β.ΙV Περιεχόμενο σε λίπη.....	36
2.2.β.V Περιεχόμενο σε μέταλλα και βιταμίνες.....	36
2.2.β.V Περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά.....	37
2.2.δ Μέθοδοι Επεξεργασίας.....	38
2.2.ε Τάσεις στην αγορά .....	38
Κεφάλαιο 3: Εκχυλίσαις.....	40
3.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών .....	40
3.2 Χημικές εκχυλίσαις .....	41
3.2.1 Αλκαλική εκχύλιση .....	41
3.2.2 Αποτίμηση συμβατικών εκχυλίσεων.....	42
3.3 Εκχυλίσαις με υπερήχους (UAE, Ultrasound Assisted Extractions).....	42
3.2 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων.....	43
Κεφάλαιο 4. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας.....	44
4.1 Υλικά.....	44

4.2 μέθοδοι.....	44
4.2.1 διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών .....	45
4.2.1.1 Εκχύλιση.....	45
4.2.1.1.α Αλκαλική εκχύλιση.....	45
4.2.1.1.β εκχύλιση με υπερήχους.....	46
4.2.1.2 Διήθηση .....	47
4.2.1.3 Καταβύθιση.....	48
4.2.1.4 φυγοκέντρηση .....	49
4.2.1.5 Επαναδιάλυση .....	50
4.2.1.6 λυοφιλίωση.....	50
4.2.1.7 Μετρήσεις ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	51
4.2.1.8 φυσικοχημικές αναλύσεις πρωτεϊνών.....	54
4.2.1.8.α Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Particle Size Distribution).....	54
4.2.1.8.β (Water and oil holding capacity).....	55
4.2.1.8.γ διαλυτότητα πρωτεϊνών .....	55
4.2.2 διαδικασία απομόνωσης γαλακτοολιγοσακχαριτών .....	56
4.2.2.1 επεξεργασία πρώτης ύλης.....	56
4.2.2.2 εκχύλιση.....	56
4.2.2.2.α εκχύλιση στερεού-υγρού.....	57
4.2.2.2.α εκχύλιση στερεού υγρού με την βοήθεια μικροκυμάτων ( MAE).....	57
4.2.2.3 Διήθηση .....	58
4.2.2.4 Φυγοκέντρηση .....	58
4.2.2.5 απομόνωση ξηρού εκχυλίσματος.....	58
4.2.2.5.α λυοφιλίωση .....	58
4.2.2.5.β Περιστροφική Εξάτμιση.....	58
4.2.2.6 ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων .....	59
Κεφάλαιο 5: επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	61
5.1 μετρήσεις πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....	61
5.1.1 μετρήσεις ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	61
5.1.2 πρότυπη καμπύλη Bradford .....	63
5.1.3 μετρήσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου .....	64
5.1.3.1 στατιστική ανάλυση.....	68
5.1.4 φυσικοχημικές μετρήσεις.....	69
5.1.4.1 διακύμανση μεγέθους σωματιδίων .....	69
5.1.4.2 δυνατότητες κατακράτησης νερού και ελαίου .....	70
5.1.4.3 διαλυτότητα πρωτεϊνών .....	71

5.2 μετρήσεις εκχυλισμάτων γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	72
5.2.1 μετρήσεις ξηρού εκχυλίσματος' .....	72
5.2.2 ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	74
5.2.2.1 καμπύλες αναφοράς πρότυπων σακχάρων .....	74
5.2.2.2 ποιοτική ανάλυση εκχυλισμάτων .....	76
5.2.2.3 ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων .....	90
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις .....	93
6.1: Συμπεράσματα .....	93
6.2 Μελλοντικές προτάσεις.....	94
Κεφάλαιο 7: Βιβλιογραφία.....	95

## Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου σε κιλά ανά 100 κιλά παραγόμενης πρωτεΐνης για διάφορα προϊόντα .....	23
Εικόνα 2: κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής οσπρίων από το 2014 έως το 2019 σε μετρικούς τόνους.....	25
Εικόνα 3: μέση κατανάλωση οσπρίων κατά κεφαλήν ανά μέρα για διάφορες περιοχές (2011-2013) .....	25
Εικόνα 4: διακύμανση της συνολικής παραγωγής ρεβιθίου ανά τα χρόνια σε Ινδία, Ασία και ολόκληρο τον κόσμο.....	29
Εικόνα 5: οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση ρεβιθίου.....	30
Εικόνα 6: χημικοί τύποι α)γαλακτοολιγοσακχαριτών β) ισοφλαβονών και γ) καροτενοειδών που συναντώνται στο ρεβίθι .....	32
Εικόνα 7: δράση συμβατικών (CE) και μη συμβατικών (NCE) εκχυλίσμων στο κύτταρο.....	41
Εικόνα 9: διάγραμμα ροής για τις διεργασίες απομόνωσης πρωτεϊνών.....	44
Εικόνα 10: διάγραμμα ροής για τις διεργασίες απομόνωσης γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	45
Εικόνα 11: διάταξη θαλάμου υπερήχων και μικροκυμάτων.....	47
Εικόνα 12: πειραματική διαδικασία διήθησης.....	48
Εικόνα 13: πειραματική διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών .....	49
Εικόνα 14: ενδεικτικό της καταβύθισης πρωτεϊνών .....	49
Εικόνα 15: Διάταξη φυγοκέντρησης.....	50
Εικόνα 16: Διάταξη λυοφιλίωσης.....	51
Εικόνα 17: Διάταξη φασματοφωτόμετρου UV.....	52
Εικόνα 18: Διαδικασία παρασκευής διαλύματος Bradford.....	53
Εικόνα 19: Αλλαγή χρώματος από την προσθήκη διαλύματος πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε διάλυμα Bradford .....	54
Εικόνα 20: Διάταξη Laser diffraction particle size analyzer.....	55
Εικόνα 21: Τελική μορφή πρώτης ύλης.....	56
Εικόνα 22: Διάταξη περιστροφικής εξάτμισης .....	59

## Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: περιεχόμενο α-γαλακτοολιγοσακχαριτών στους σπόρους ρεβιθιού.....	33
Πίνακας 2: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των συμβατικών εκχυλίσεων .....	61
Πίνακας 4: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων με βοήθεια υπερήχων αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:12 .....	62
Πίνακας 5: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων με βοήθεια υπερήχων αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:15 .....	62
Πίνακας 6: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων συμβατικών αλκαλικών εκχυλίσεων.....	64
Πίνακας 7: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 9.....	65
Πίνακας 8: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 12.....	66
Πίνακας 9: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15.....	66
Πίνακας 10 : Στατιστική ανάλυση ANOVA για τις παραμέτρους της συμβατικής εκχύλισης....	68
Πίνακας 11 : Στατιστική ανάλυση ANOVA για τις παραμέτρους της εκχύλισης με την τεχνική των υπερήχων .....	69
Πίνακας 12: Μετρήσεις δυνατότητας κατακράτησης νερού εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με υπερήχους.....	71
Πίνακας 13: Μετρήσεις δυνατότητας κατακράτησης νερού εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με υπερήχους.....	71
Πίνακας 14: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα υδατικών εκχυλίσεων.....	72
Πίνακας 15: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα αιθανολικών εκχυλίσεων .....	73
Πίνακας 16: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 60-40 .....	73
Πίνακας 17: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 75-25 .....	74
Πίνακας 18: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που πραγματοποιούνται υπό την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας.....	74
Πίνακας 19: χρόνοι έκλουσης πρότυπων σακχάρων .....	75
Πίνακας 20: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40 .....	91
Πίνακας 21: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 75:25 .....	91
Πίνακας 22: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν την βοήθεια μικροκυμάτων.....	92

## Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα πρότυπης καμπύλης Bradford.....	63
Διάγραμμα 2: Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποδόσεων σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων των συμβατικών εκχυλίσεων.....	65
Διάγραμμα 3: περιεχόμενο σε πρωτεΐνη των εκχυλισμάτων για ισχύ υπερήχων 450 Watt.....	67
Διάγραμμα 4: περιεχόμενο σε πρωτεΐνη των εκχυλισμάτων για ισχύ υπερήχων 750 Watt.....	67
Διάγραμμα 5: διακύμανση μεγέθους σωματιδίων για εκχύλιση με επίδραση υπερήχων.....	70
Διάγραμμα 6: διακύμανση μεγέθους σωματιδίων για εκχύλιση συμβατικής εκχύλισης.....	70
Διάγραμμα 7: Μεταβολή της % διαλυτότητας των πρωτεϊνών σε σχέση με το pH.....	72
Διάγραμμα 8: πρότυπη καμπύλη αναφοράς σουκρόζης.....	75
Διάγραμμα 9: πρότυπη καμπύλη αναφοράς σταχυόζης.....	75
Διάγραμμα 10: πρότυπη καμπύλη αναφοράς ραφφινόζης.....	76
Διάγραμμα 11: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A1.....	76
Διάγραμμα 12: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A2.....	77
Διάγραμμα 13: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A3.....	77
Διάγραμμα 14: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A4.....	78
Διάγραμμα 15: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A5.....	78
Διάγραμμα 16: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A6.....	79
Διάγραμμα 17: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B1.....	79
Διάγραμμα 18: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B2.....	80
Διάγραμμα 19: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B3.....	80
Διάγραμμα 20: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B4.....	81
Διάγραμμα 21: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B5.....	81
Διάγραμμα 22: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B6.....	82
Διάγραμμα 23: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ1.....	82
Διάγραμμα 24: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ2.....	83
Διάγραμμα 25: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ3.....	83
Διάγραμμα 25: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ4.....	84
Διάγραμμα 26: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ5.....	84
Διάγραμμα 27: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ6.....	85
Διάγραμμα 28: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ1.....	85
Διάγραμμα 29: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ2.....	86
Διάγραμμα 30: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ3.....	86
Διάγραμμα 31: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ4.....	87
Διάγραμμα 32: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ5.....	87
Διάγραμμα 33: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ6.....	88

Διάγραμμα 34: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE1.....	89
Διάγραμμα 35: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE2.....	89
Διάγραμμα 36: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE2.....	90



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πλανήτης σήμερα έχει οδηγηθεί σε μία κατάσταση υπερπληθυσμού και ταυτόχρονα οι διατροφικές συνήθειες του μέσου ανθρώπου βασίζονται όλο και περισσότερο στην κατανάλωση κρέατος και παραγώγων του. Η υποστήριξη αυτών των επιπέδων κατανάλωσης κρέατος από την βιομηχανία της κτηνοτροφίας συνεπάγεται την υπέρμετρη εκμετάλλευση εδαφικών, υδατικών και ενεργειακών πόρων του πλανήτη και συμβάλλει στην έξαρση του φαινομένου του θερμοκηπίου και την διαταραχή των κύκλων αζώτου και φωσφόρου. Επιπλέον, η σημερινή υπερκατανάλωση κρέατος εμφανίζει ενδείξεις, σε μακροπρόθεσμη βάση, συσχέτισης με καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνου του παχέος εντέρου ακόμα και θνησιμότητας, ενώ συνδέεται με παράγοντες επιβάρυνσης της υγείας όπως η αύξηση του δείκτη της LDL χοληστερόλης. Επομένως, η στροφή προς εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης για την υποκατάσταση και την αντικατάσταση του κρέατος κρίνεται σταδιακά όλο και περισσότερο αναγκαία.

Τα όσπρια αποτελούν ελκυστικές επιλογές για την αντικατάσταση του κρέατος, λόγω του υψηλού πρωτεϊνικού τους περιεχομένου, των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει η κατανάλωσή τους για την υγεία του ανθρώπου και του εύρους των δυνατοτήτων τους που ακόμα δεν έχουν εκμεταλλευθεί σε ικανοποιητικό βαθμό από τον άνθρωπο. Το ρεβίθι είναι ένα από τα όσπρια που συγκεντρώνουν τα παραπάνω πλεονεκτήματα λόγω της περιεκτικότητάς του σε υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες και βιοδραστικά στοιχεία, όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, ενώ είναι γνωστό για την αντικαρκινική και αντιοξειδωτική του δράση, την συμβολή του κατά της παχυσαρκίας και του διαβήτη, όσο και για την μείωση της LDL χοληστερόλης. Η κατανάλωση γαλακτοολιγοσακχαριτών γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη λόγω της ευεργετικής τους δράσης για την εντερική υγεία, αφού δρουν ως προβιοτικά.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει σαν αντικείμενο τη διερεύνηση αποδοτικών τρόπων απομόνωσης πρωτεϊνών και γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω της διεργασίας της εκχύλισης, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ρεβίθι. Γίνεται μελέτη της εφαρμογής τεχνικών υψηλής ενέργειας ταυτόχρονα με την διεργασία της εκχύλισης και συγκεκριμένα των υπερήχων και της μικροκυματικής ακτινοβολίας. Σύμφωνα με μια σειρά από μετρήσεις γίνεται προσπάθεια να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος των τεχνικών υψηλής ενέργειας στο περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά για τις λειτουργικές τους ιδιότητες, αλλά και όσον αφορά την οικονομία της διεργασίας και τα πιθανά οφέλη που μπορούν να προκύψουν, ώστε αυτή να καθίσταται φιλικότερη προς το περιβάλλον.

# Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Κεφάλαιο 1: Σύγχρονες τάσεις στην αγορά τροφίμων

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ενταθεί οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που οφείλονται στην ανθρώπινη δραστηριότητα και σχετίζονται με την κλιματική αλλαγή, τις επιδράσεις στην βιοποικιλότητα, την αποψίλωση των δασών και τις διαταραχές των κύκλων του αζώτου, αλλά και του φωσφόρου. Αυτές οι επιπτώσεις είναι επακόλουθο του σημερινού τρόπου διαβίωσης, αλλά κυρίως κατανάλωσης τροφής και δόμησης της γεωργίας. Αν δεν υπάρξουν ριζικές αλλαγές σε πολλούς από τους τομείς που αφορούν την τροφή του ανθρώπου, μέχρι το 2050 οι διαθέσιμες εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης, οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου, η χρήση νερού για άρδευση και οι επιπλοκές στους κύκλους του αζώτου και του φωσφόρου θα βρίσκονται εκτός ελέγχου για τα δεδομένα του πλανήτη. Είναι δεδομένο, λοιπόν, πως με τις σύγχρονες μεθόδους και την ποσότητα παραγωγής της τροφής του πληθυσμού, η διαθεσιμότητα καλλιεργήσιμων εκτάσεων γης, καθώς και των αντίστοιχων πόρων που χρησιμοποιούνται έχει φθάσει πλέον, εμφανώς, σε ένα σημείο καμπής, ταυτόχρονα φυσικά με την άμεση επίδραση στην υπερθέρμανση του πλανήτη. [1]

Παράλληλα με τις εμφανείς επιπτώσεις της κτηνοτροφίας στο οικοσύστημα, γίνεται ολοένα και περισσότερο συζήτηση σχετικά με τον αντίκτυπο που έχει άμεσα στην υγεία του ανθρώπου η κατανάλωση κρέατος και ζωικών προϊόντων γενικότερα και ιδιαίτερα η σταδιακή αύξηση αυτής. Η συζήτηση αυτή γεννά ερωτήματα σε πολλούς καταναλωτές, με αποτέλεσμα να στρέφονται σε εναλλακτικές διατροφικές επιλογές, ο καθένας σε διαφορετικό βαθμό, οι οποίες σε βάθος χρόνου μπορούν να συνεισφέρουν στην σταδιακή υποκατάσταση των προϊόντων της κτηνοτροφίας. [1]

### 1.1 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις κτηνοτροφίας

Τα προϊόντα κτηνοτροφίας είναι υπεύθυνα για μεγαλύτερη επιβάρυνση του περιβάλλοντος όσον αφορά το φαινόμενο του θερμοκηπίου και την διαταραχή των κύκλων του αζώτου και του φωσφόρου, όπως επίσης και για υπέρμετρη χρήση διαθέσιμων πόρων και γης σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτικά προϊόντα.

Οι εκπομπές που επιδεινώνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου αντιστοιχούν, κυρίως, στις τεράστιες ποσότητες κοπριάς και του τρόπου διαχείρισής της, καθώς και των διεργασιών ζυμώσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται στο εσωτερικό των εντέρων των μηρυκαστικών ζώων που εκτρέφονται. Ενδεικτικά, τα ζωικά προϊόντα, στα οποία εντάσσονται το κρέας, τα αυγά, τα γαλακτοκομικά καθώς και οι καλλιέργειες που υποστηρίζουν την ζωική βιομηχανία καλύπτουν το 83% της καλλιεργήσιμης γης του πλανήτη και ευθύνονται για το 58% των διαφόρων εκπομπών της συνολικής βιομηχανίας τροφίμων. Παρά την μεγάλη επιβάρυνση που προκαλούν στον πλανήτη, προσφέρουν μόνο το 37% των πρωτεϊνών της διατροφής του μέσου ανθρώπου, όπως και μόνο το 18% των συνολικών θερμίδων του.

Ο σημαντικότερος παράγοντας που βρίσκεται πίσω από όλον αυτόν τον αντίκτυπο των προϊόντων της ζωικής βιομηχανίας είναι η υψηλή κατανάλωση τροφής από τα ίδια τα ζώα κατά

την εκτροφή τους. Η τροφή, αυτή, προφανώς προμηθεύεται από τις καλλιέργειες, οι οποίες υπάρχουν για να υποστηρίξουν αποκλειστικά την ζωική βιομηχανία. Ξεκινά, λοιπόν, μια νέα συζήτηση σχετικά με το κατά πόσο μη συμφέρον ενεργειακά είναι αυτό. Είναι προφανές ότι η καλλιέργεια τροφής για τα ζώα, τα οποία μετέπειτα θα αποτελέσουν τα ίδια τροφή για τον άνθρωπο, είναι κατά πολύ λιγότερο ενεργειακά αποδοτική από την απευθείας καλλιέργεια τροφής για τον ίδιο τον άνθρωπο.

Δεδομένου ότι ο πληθυσμός του πλανήτη αναμένεται να αυξηθεί ακόμη περισσότερο μέσα στα επόμενα χρόνια, οι ανάγκες για τροφή, συνεισώς και πρωτεΐνη, θα αυξηθούν κατακόρυφα. Επομένως, η ενδεχόμενη αύξηση της παραγωγής ζωικών προϊόντων, λόγω των υψηλότερων αναγκών σε κρέας, παράγωγα του (αυγά, γαλακτοκομικά) και επιπλέον σε τροφές που βασίζονται στα προϊόντα της κτηνοτροφίας, θα οδηγήσει σε επιπλέον κάλυψη τεράστιων εκτάσεων καλλιεργήσιμης γης, η οποία θα συνδυαστεί με αποψίλωση των δασών, με άμεσες συνέπειες στην ισορροπία της βιοποικιλότητας, όπως φυσικά και αύξηση της εκπομπής των επιβλαβών αερίων του θερμοκηπίου. Αυτή η εκτεταμένη κάλυψη εκτάσεων γης για την υποστήριξη της κτηνοτροφίας συμβάλλει, επίσης, στην κατανάλωση τεράστιων ποσοτήτων νερού, καθώς και ρύπανσής του, εξαιτίας των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες. Τέλος, εντείνεται και η ρύπανση του εδάφους σε συνδυασμό με την διάβρωσή του.

Η διατήρηση των σημερινών διατροφικών συνηθειών δεν είναι πλέον βιώσιμη. Αυτό ισχύει διότι είναι απαραίτητη η αύξηση της ποσότητας τροφής για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών του αυξανόμενου πληθυσμού, χωρίς αυτή να συνοδεύεται από τις έως τώρα σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Προτείνεται, λοιπόν, ιδίως για τις χώρες του δυτικού πολιτισμού να μειωθεί σταδιακά η μέση κατανάλωση ζωικών προϊόντων ανά άνθρωπο. Ταυτόχρονα, όλο και περισσότερη καλλιεργήσιμη γη θα αξιοποιείται απευθείας για την προμήθεια τροφής των ανθρώπων και όχι για σκοπούς εκτροφής ζώων. Επιτυγχάνεται, με αυτόν τον τρόπο, τεράστια εξοικονόμηση ενέργειας και νερού. [2]

## 1.2 κατανάλωση ζωικών προϊόντων και υγεία

Η κατανάλωση κρέατος από τον άνθρωπο αρχίζει 2,6 εκατομμύρια χρόνια πριν, όπου άρχισε να διευρύνεται σε μια έως τότε χορτοφαγική διατροφή. Αυτό προκύπτει από την μορφολογία των δοντιών των πρωτόγονων. Αν και ακόμα δεν είναι αποδεδειγμένοι οι λόγοι που οι πρωτόγονοι ξεκίνησαν να τρέφονται με κρέας ζώων, ενδέχεται αυτό να οφείλεται στην ξηρασία της αφρικανικής ηπείρου, όπου και βρισκόνταν, η οποία αναγκαστικά τους οδήγησε να προσαρμοστούν σε νέες διατροφικές συνήθειες. Η πρόσληψη όλο και μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεϊνών βοήθησε στην σωματική ανάπτυξη των ανθρώπων, την διαμόρφωση και την διατήρηση των σημερινών τους χαρακτηριστικών. Ταυτόχρονα, η ανάγκη της προσαρμογής σε αυτές τις διατροφικές συνήθειες για την επιβίωσή τους, οδήγησε στην φυσική επιλογή των ανθρώπων που ήταν περισσότερο ικανοί να τραφούν και να μεταβολίσουν τον ζωικό ιστό. Έκτοτε, η κατανάλωση κρέατος όχι μόνο συνεχίστηκε, αλλά σταδιακά πέρασε στο στάδιο της κτηνοτροφίας, μετά από την “γεωργική επανάσταση” 9000 με 11000 χρόνια πριν. Τα τελευταία 100 χρόνια η τεχνολογική ανάπτυξη έδωσε την δυνατότητα για μαζική παραγωγή ζωικών προϊόντων και διευκόλυνση στην διανομή τους, με αποτέλεσμα την υπερκάλυψη των διατροφικών αναγκών του αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού. Συγκεκριμένα, τα τελευταία 50 χρόνια η συνολική ποσότητα παραγωγής κρέατος έχει τετραπλασιαστεί, με την Ασία σήμερα να πρωταγωνιστεί παράγοντας πάνω από 100 εκατομμύρια τόνους κρέατος, περίπου δηλαδή το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής. Η αυξημένη, αυτή, παραγωγή με την πάροδο του χρόνου, μεταφράζεται και σε μεγαλύτερη ποσότητα κρέατος που καταναλώνει ο μέσος άνθρωπος ανά χρόνο. Χαρακτηριστικά, συγκρίνονται οι αντίστοιχες τιμές για τα έτη 1961 και 2014, όπου για το

πρώτο είναι 20 κιλά και για το δεύτερο 43 κιλά, βλέποντας ότι η ποσότητα έχει σχεδόν διπλασιαστεί. [3]

Η σημερινή υπερκατανάλωση κρέατος και γενικότερα ζωικών προϊόντων έχει οδηγήσει σε ερωτήματα σχετικά με τις επιδράσεις της στην ανθρώπινη υγεία. Μέχρι τώρα δεν έχει αποδειχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό η συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης κρέατος, συγκεκριμένα κόκκινου (βοδινό, χοιρινό κλπ) και επεξεργασμένου κρέατος με επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Αυτό συμβαίνει, κυρίως, διότι οι έρευνες βασίζονται περισσότερο σε δεδομένα παρατηρήσεων. Το σύστημα Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) χαρακτηρίζει τις έρευνες αυτού του τύπου ως “low grade” evidence. Στο προσκήνιο, όμως, έρχονται νέου τύπου έρευνες, οι οποίες αξιολογούν αλλαγές σε παραμέτρους που αφορούν τον τρόπο ζωής και τις διατροφικές συνήθειες διαφόρων πληθυσμών. [3],[4]

Οι έρευνες που αφορούν την επίδραση των διατροφικών συνηθειών στην υγεία του ανθρώπου παρουσιάζουν πολλές ιδιαιτερότητες. Αρχικά, οι διατροφικές συνήθειες αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου, ενώ η ποιότητα διατροφής σε κάθε σπίτι μεταβάλλεται σε σχέση με παράγοντες που αφορούν το εισόδημα του σπιτιού, καθώς και την περιοχή που αυτό βρίσκεται. Επιπλέον, οι έρευνες που αφορούν στις μεταβολές σε νοσηρότητα και θνησιμότητα των αλλαγών σε παραμέτρους σχετικές με παραλλαγές διατροφικών συνηθειών, απαιτούν μεγάλη ποσότητα δειγμάτων, μεγάλη περίοδο παρακολούθησης, καθώς και τέλεια εκτέλεση, κάτι το οποίο είναι σχεδόν αδύνατο. Αυτού του είδους οι έρευνες καθίστανται δυσκολότερες και στα πλαίσια κοινωνικών και πολιτισμικών κριτηρίων. Η αντικατάσταση κάποιων φαγητών μπορεί να μην είναι αποδεκτή από κάποιες κουλτούρες, ενώ τίθεται ζήτημα σχετικά με το αν κατά την δειγματοληψία θα πρέπει να εξετάζεται ένα μέλος ή ολόκληρη η οικογένεια. Για αυτούς τους λόγους, οι έρευνες αυτές αναφέρονται σε βραχυπρόθεσμες μεταβολές διατροφικών συνηθειών, ώστε να αποφανθούν σχετικά με δείκτες ασθενειών, όπως π.χ. η LDL χοληστερόλη. Πράγματι, προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά τις αντίστοιχες επιπτώσεις εξεταζόμενων διατροφικών συνηθειών, όμως δεν μπορούν να αξιοποιηθούν για την συλλογή δεδομένων για ασθένειες όπως ο καρκίνος, για καρδιοαναπνευστικά προβλήματα ή και την θνησιμότητα. Αρκετές μακροπρόθεσμες έρευνες προσπαθούν να συσχετίσουν την κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος με καρδιαγγειακές παθήσεις (συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών επεισοδίων και του εμφράγματος του μυοκαρδίου), του διαβήτη τύπου 2, του καρκίνου (συγκεκριμένα καρκίνος του παχέος εντέρου) και της θνησιμότητας. Οι μελέτες, αυτές, κατά κύριο λόγο, καταδεικνύουν ότι για τον άνθρωπο η κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη τύπου 2, καρκίνο και θνησιμότητα. Μια χαρακτηριστική ανάλυση, η οποία έχει ως αντικείμενο μελέτης τις επιπτώσεις στην υγεία, διατροφών χαμηλότερης περιεκτικότητας σε κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας συγκριτικά με άλλες υψηλότερης περιεκτικότητας, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χαμηλότερη κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος σχετίζεται με 13% σχετική μείωση των θανάτων από γενικά αίτια, 14% μείωση των θανάτων λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων και 24% μείωση των περιπτώσεων διαβήτη τύπου 2. Επιπλέον, συμπεριλαμβανομένης άλλης μιας ανάλυσης, στην οποία συμμετείχαν πάνω από 6 εκατομμύρια άνθρωποι, διαπιστώθηκε η μειωμένη πρόσληψη κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος εμφανίζει συσχέτιση με μείωση κατά 7% στη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο. Είναι διαδεδομένο, επίσης, πως η υποκατάσταση κόκκινου, καθώς και επεξεργασμένου κρέατος με άλλα τρόφιμα που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές πρωτεΐνες είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την θνησιμότητα από γενικά αίτια, αλλά και λόγω καρκίνου ή καρδιαγγειακών παθήσεων. Τέλος, πρόσφατες έρευνες, οι οποίες εστιάζουν στην συσχέτιση κατανάλωσης κόκκινου κρέατος και των παραγόντων που αυξάνουν τις πιθανότητες καρδιαγγειακών

παθήσεων, αποδεικνύουν πως η αντικατάσταση του κόκκινου κρέατος με ποικιλία εκλεκτών τροφών, πλούσιων σε πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης οδηγεί σε ευνοϊκές αναλογίες λιπαρών οξέων στον οργανισμό και με αυξημένη την κατανάλωση ξηρών καρπών ή παρθένου ελαιόλαδου μειώνεται ο ρυθμός εμφάνισης περιστατικών που σχετίζονται με καρδιαγγειακά προβλήματα. [3] [5]

Δεδομένων όλων των αποδεδειγμένα αρνητικών επιπτώσεων της κατανάλωσης κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, πόσο μάλλον της σημερινής υπερκατανάλωσής τους, συστήνεται στους ανθρώπους η υιοθέτηση διατροφικών συνηθειών, οι οποίες θα χαρακτηρίζονται από πολύ μικρότερες ποσότητες αυτών των τροφών. [3]

### 1.3 Εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών

Είναι μεγάλη ανάγκη, πλέον, να αυξηθεί η ποσότητα πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης που καταναλώνει ο μέσος άνθρωπος. Οι άνθρωποι οφείλουν σταδιακά, λοιπόν, να αξιοποιήσουν την αρκετά μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων τροφών υψηλού πρωτεϊνικού περιεχομένου και φυτικής προέλευσης, αντί να περιορίζονται, κυρίως, στα ζωικά προϊόντα για την κάλυψη των αναγκών τους σε πρωτεΐνη. Συνεπώς, η βιομηχανία ξεκινά να στρέφεται όλο και περισσότερο στην σύνθεση και την διάθεση νέων προϊόντων φυτικής προέλευσης, τα οποία θα αποτελούν εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών σε σχέση με τα αντίστοιχα προϊόντα της ζωικής βιομηχανίας. Έως τώρα οι πιο ευρέως χρησιμοποιημένες εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών είναι η σόγια, η βρώμη και το μπιζέλι. Αυτά τα προϊόντα έχουν, συγκριτικά με ζωικά προϊόντα, μικρότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, καθώς και μικρότερες απαιτήσεις για καλλιεργήσιμη γη ανά κιλό παραγόμενου προϊόντος και ανά κιλό παραγόμενης πρωτεΐνης. Καινοτόμες ιδέες θα πρέπει να αναδεικνύονται συνεχώς, τόσο όσον αφορά την χρήση νέων φυσικών προϊόντων ως πηγών πρωτεΐνης, αλλά και την αξιοποίηση πλούσιων πρωτεϊνικά ρευμάτων σε ήδη υφιστάμενες διεργασίες, ώστε να εμπλουτιστούν με αυτά άλλα προϊόντα της αγοράς. Έτσι, με τον παραπάνω συνδυασμό μπορούν να προκύψουν προϊόντα, τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν ακόμα περισσότερο στην σταδιακή υποκατάσταση των ζωικών προϊόντων.

Σταδιακά, μεγάλος αριθμός εταιριών προσανατολίζεται προς την παραγωγή προϊόντων που ομοιάζουν γευστικά με τα αντίστοιχα ζωικά προϊόντα. Η ανάπτυξη των καινοτόμων, αυτών, εταιριών, οι οποίες θα ανταγωνίζονται τις αντίστοιχες εταιρίες την βιομηχανίας κρέατος, μπορεί να συμβάλλει σε μεγάλο βεληνεκούς αλλαγές, τόσο στην υγεία του ανθρώπου, όσο και στα πλαίσια της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Τα εναλλακτικά, αυτά, προϊόντα που στοχεύουν στην υποκατάσταση του κρέατος είναι κυρίως φυτικής προέλευσης, αλλά έχουν αναφερθεί επίσης προσεγγίσεις σε κυτταρικό επίπεδο και λόγω της σημερινής τεχνολογικής προόδου, έχει επιτευχθεί μια αρκετά καλή προσέγγιση, γευστικά, των προϊόντων την βιομηχανίας κρέατος, η οποία δεν συνοδεύεται από τις σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και την μαζική θανάτωση ζώων. Για παράδειγμα, η εταιρία Beyond Meat® πρόβη στην χρηματοδότηση μιας έρευνας για την αξιολόγηση του συστήματος παραγωγής ενός burger, με πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, συγκριτικά με την αξιολόγηση του κύκλου ζωής του βόειου κρέατος. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι το burger από φυτικής προέλευσης πρώτες ύλες, κατά την παραγωγή του οδηγεί σε 90% μικρότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ενώ καταναλώνεται 46% λιγότερη ενέργεια και έχει αμελητέα επιβάρυνση όσον αφορά τους υδάτινους πόρους και την χρήση εκτάσεων καλλιεργήσιμης γης. Παρά τα δεδομένα πλεονεκτήματα της υποκατάστασης των ζωικών προϊόντων, αρκετές έρευνες, όπως για παράδειγμα μια έρευνα που διεξήχθη στις ΗΠΑ καταδεικνύει πως το μεγαλύτερο ποσοστό των καταναλωτών (>70%) προτιμάει ακόμα το πραγματικό βόειο κρέας, ακόμα και αν η τιμή των υποκατάστατων του μειωνόταν στο μισό. Συγκεκριμένα, χορτοφάγοι, άνθρωποι νεότεροι και υψηλότερου μορφωτικού επιπέδου

αναμενόταν να είναι αυτοί, οι οποίοι θα εξέφραζαν προτίμηση προς τα παράγωγα του βοδινού κρέατος. Επιπλέον, η πρόταση για μέτρα που αφορούν την αύξηση της φορολογίας των κρεατικών προϊόντων, προς όφελος του περιβάλλοντος και των ίδιων των ζώων, δεν υιοθετήθηκε από την μεγαλύτερη μερίδα του πληθυσμού. Τα αρνητικά, αυτά, αποτελέσματα δικαιολογούνται από την φυσιολογική επιφυλακτικότητα απέναντι σε καινοτόμα προϊόντα, καθώς και στην έλλειψη λεπτομερούς πληροφόρησης για την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία. Αυτό, ακριβώς, είναι και το σημείο στο οποίο θα πρέπει να σταθούν οι καινοτόμες αυτές εταιρίες, έτσι ώστε να καταφέρουν να μεταπείσουν τους καταναλωτές και να τους οδηγήσουν μαζικά σε ριζικές αλλαγές, όσον αφορά τις διατροφικές τους συνήθειες. [3],[6]

### 1.3.α εναλλακτικές φυτικής προέλευσης

Οι εναλλακτικές φυτικής προέλευσης, του κρέατος, απευθύνονται κατά κύριο λόγο σε χορτοφάγους και vegan καταναλωτές. Πλέον, έχοντας ως στόχο να διευρύνουν το καταναλωτικό τους κοινό, οι καινοτόμες εταιρίες σχεδιάζουν τα εναλλακτικά τους προϊόντα έτσι ώστε να έχουν παρόμοια γεύση, οσμή και πολλές φορές όψη με το πραγματικό ζωικό κρέας. Σε αυτά τα προϊόντα φυτικής προέλευσης προστίθενται καθαρά φυτικά εκχυλίσματα, υψηλού πρωτεϊνικού περιεχομένου και όχι ολόκληρες οι φυτικές πρωτεΐνες. Ωστόσο, ανά εταιρία μπορεί να παρατηρηθεί και διαφορετική φιλοσοφία στον σχεδιασμό και την παρασκευή των τελικών προϊόντων. Για παράδειγμα, στο Beyond Meat® burger χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες από ποικιλία λαχανικών, λίπη που προέρχονται από φυτικά έλαια, πρόσθετα για χρώμα και γεύση από τεύτλα και εκχυλίσματα χυμού μήλου και ως μέταλλα προστίθενται νάτριο, κάλιο, σίδηρο και ασβέστιο. Το Impossible Foods® burger χρησιμοποιεί πρωτεΐνη γενετικά τροποποιημένης σόγιας και πατάτας και επιτυγχάνεται γεύση αίματος, που περιέχει σίδηρο, από γενετικά τροποποιημένη μαγιά σόγιας (λεγμοσφαιρίνη σόγιας), έτσι ώστε να έχει παρόμοια όψη, μυρωδιά και γεύση με το αίμα των ζώων (αιμοσφαιρίνη). [7],[8],[9]

Η επεξεργασία που υφίστανται τα συστατικά σε κάθε προϊόν της βιομηχανίας τροφίμων χαρακτηρίζεται από την ποσοστιαία μείωση των φυτικών ινών και γενικότερα των θρεπτικών συστατικών που εμπεριέχονται στις πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται. Γενικότερα, τα επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να είναι υψηλότερα σε κορεσμένα λίπη, τα οποία που συνδέονται με μεταβολικές διαταραχές (ακόμη και αν προέρχονται από φυτικές πηγές). Όσον αφορά τα παραπάνω παραδείγματα συνθετικών burger το Beyond Meat® και το Impossible Foods® εμφανίζουν μηδενική χοληστερόλη, συνολικά λιγότερο λίπος, παρόμοια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ίδιες θερμίδες και περισσότερο αλάτι από ένα μπιφτέκι βοδινού ελευθέρως βοσκής. Η αίμη, η οποία εμπεριέχεται αποκλειστικά στο Impossible Foods® burger, εμφανίζεται σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το μπιφτέκι βόειου κρέατος.

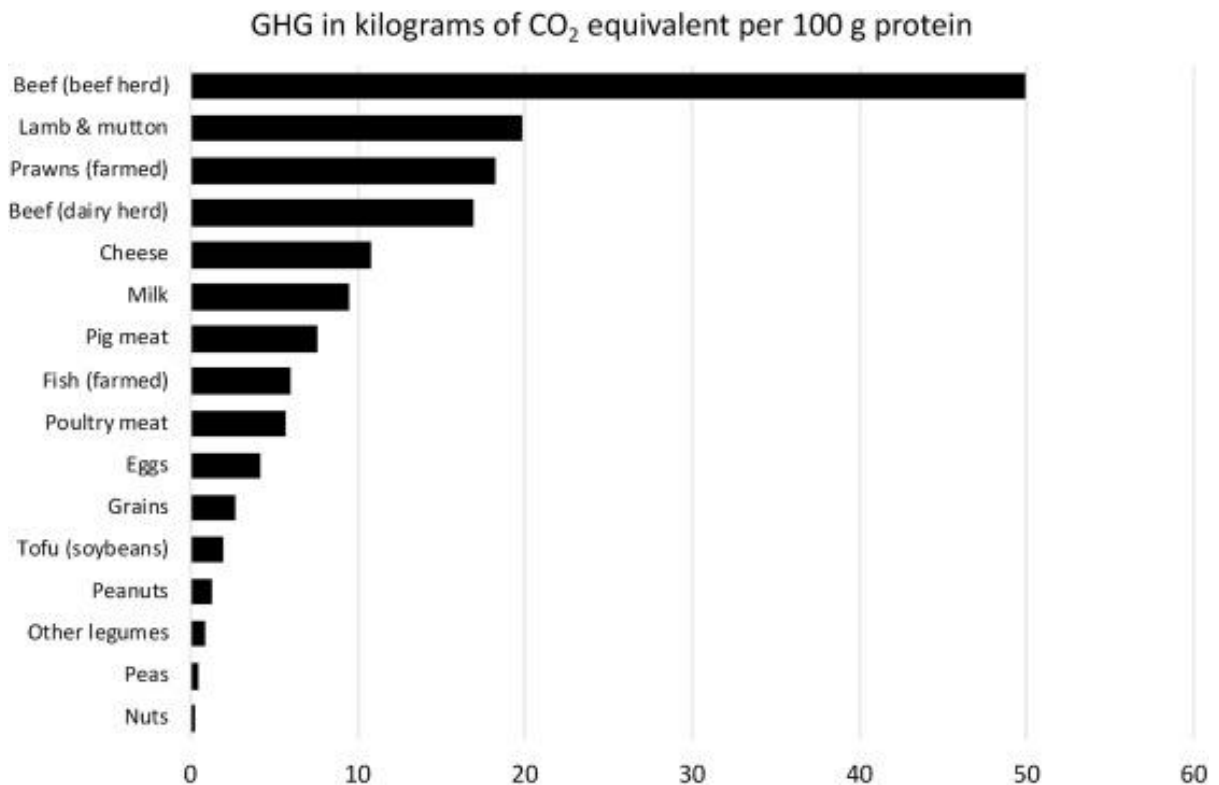
Πέρα από τις συγκρίσεις που αναφέρονται στην διατροφική αξία των προϊόντων, σημαντικότερο είναι να γίνουν συγκρίσεις, οι οποίες εστιάζουν στις επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Για τον λόγο αυτόν κρίνεται αναγκαία η χρήση συγκεκριμένων βιοδεικτών που καθιστούν ευκολότερες και περισσότερο αξιόπιστες τις αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις.

Η τεχνογνωσία γύρω από τον σχεδιασμό και την παραγωγή υποκατάστατων κρέατος εξελίσσεται γρήγορα και είναι σημαντικό αυτό να συνοδευθεί από την διασφάλιση της ποιότητάς τους και της ευεργετικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία, καθώς και στην συμβολή τους στην ευημερία του πλανήτη. Επίσης, είναι απαραίτητο, σε κοινωνικό επίπεδο, να γίνουν αναλύσεις και να προσδιοριστούν οι παράγοντες, αυτοί, που οδηγούν κάθε άτομο στην μετέπειτα στροφή του προς προϊόντα που βασίζονται σε φυτά ή ακόμα και σε κύτταρα και μακροπρόθεσμα σε

μόνιμη υιοθέτηση μιας διατροφής, όπου το κρέας έχει υποκατασταθεί ολοκληρωτικά. Μια ολιστική προσέγγιση, που δεν θα περιορίζεται στην αξιολόγηση γύρω από έναν μόνο δείκτη, θα μπορούσε να αναδείξει νέους βιοδείκτες που θα αντικατοπτρίζουν παθοφυσιολογικές αλλαγές που συνδέονται άμεσα με την κατανάλωση κρέατος. [3]

## Κεφάλαιο 2: Εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών

Ο άνθρωπος είναι αναγκαίο να προσλαμβάνει, κατά την διάρκεια της ζωής του, επαρκή ποσότητα πρωτεΐνης, μέσω της διατροφής του και υψηλής ποιότητας, δηλαδή, πλούσια στα απαραίτητα αμινοξέα και να είναι σε μορφή, τέτοια, ώστε να μπορεί να είναι εύπεπτη από τον οργανισμό, συμβάλλοντας έτσι στην σωστή ανάπτυξή του και στην διατήρηση της υγείας του στα βέλτιστα επίπεδα. Οι κυριότερες πηγές πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας, σήμερα, είναι το κρέας, τα πουλερικά, τα ψάρια, τα αυγά, οι ξηροί καρποί, τα όσπρια και τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως γάλα, γιαούρτι και τυρί. Παγκοσμίως, η κατανάλωση κρέατος αυξάνεται λόγω της ραγδαίας πληθυσμιακής αύξησης και της αύξησης των εισοδημάτων. Η βιομηχανία παραγωγής κρέατος, όπως είναι ήδη γνωστό, ευθύνεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό για τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου και την υπέρμετρη κατανάλωση υδάτινων πόρων. Από την άλλη, η διαδικασία παραγωγής οσπρίων και ξηρών καρπών συνδέεται με πολύ μικρότερες εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου.[10]



Εικόνα 1: εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου σε κιλά ανά 100 κιλά παραγόμενης πρωτεΐνης για διάφορα προϊόντα

Η διατήρηση των σημερινών διατροφικών συνηθειών, οι οποίες βασίζονται στην κατανάλωση κρέατος και ζωικών παραγώγων αποδεικνύεται μη βιώσιμη. Γίνεται, λοιπόν αντιληπτό, ότι σταδιακά οι διατροφές που περιλαμβάνουν κυρίως τροφές φυτικής προέλευσης είναι σημαντικό να επικρατήσουν, σταδιακά, στο μεγαλύτερο κομμάτι του πληθυσμού. Σημαντικές εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών αποτελούν τα όσπρια, τα βρώσιμα έντομα, τα διάφορα μακροφύκη, όπως και τα υποκατάστατα κρέατος από φυτικές πρώτες ύλες. Οι παραπάνω τροφές χαρακτηρίζονται ως περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις έναντι το κρέατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα έντομα, βέβαια, παρά το χαμηλό αποτύπωμα τους όσον αφορά τα αέρια του θερμοκηπίου, αντιμετωπίζουν μεγάλα εμπόδια κατά την προώθησή τους στην

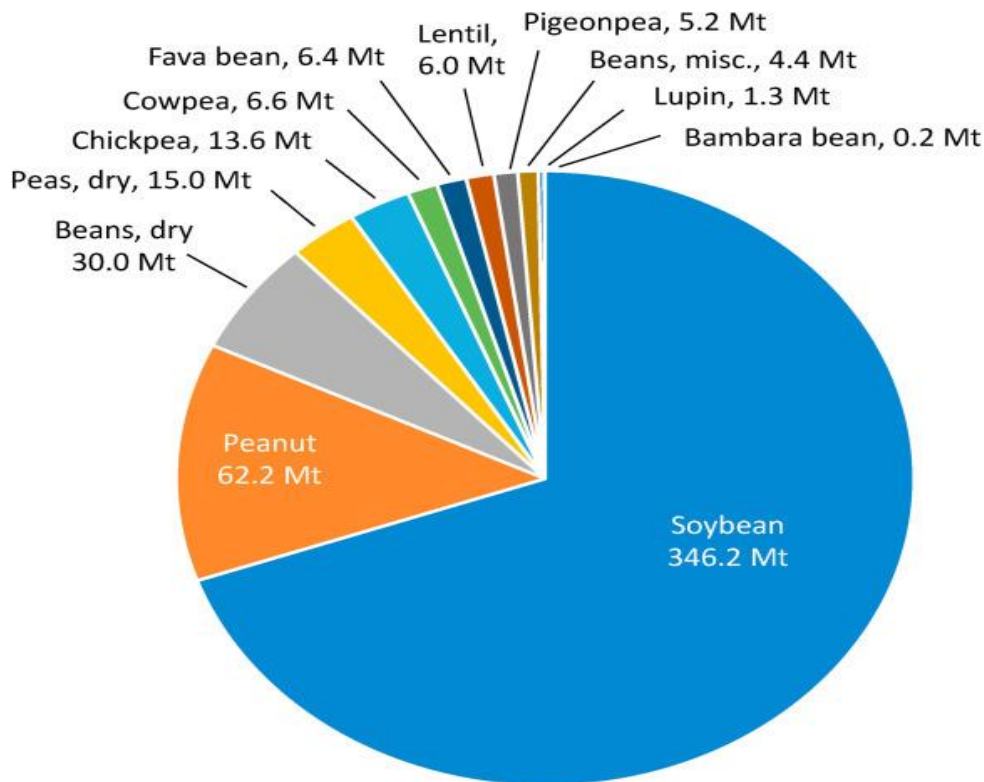


αγορά του δυτικού κόσμου, καθώς απέχουν πολύ από τα διατροφικά πρότυπα των αντίστοιχων καταναλωτών. Τα φύκια, επίσης, είναι πιθανό κάποιες φορές να δεσμεύσουν βαρέα μέταλλα, όπως αρσενικό, μόλυβδο, κάδμιο και υδράργυρο, γεγονός που εγείρει ανησυχίες σχετικά με το αν είναι ασφαλής η κατανάλωσή τους. Τα μακροφύκη είναι επίφοβα ως τρόφιμο γιατί είναι πιθανό να εμπεριέχουν σε ορισμένες περιπτώσεις κυανοτοξίνες, βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα και τα υπολείμματα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Τα οφέλη που απορρέουν από το λεγόμενο καλλιεργημένο κρέας είναι κατά κύριο λόγο κερδοσκοπικά. Επίσης, τα υποκατάστατα του κρέατος είναι σε μεγάλο βαθμό επεξεργασμένα και επιπλέον το κόστος τους είναι μεγαλύτερο για τον καταναλωτή σε σχέση, για παράδειγμα, με τα όσπρια. [10]

Τα όσπρια, από την πλευρά τους, πέρα από το γεγονός ότι έχουν ευνοϊκότερο αποτύπωμα σε εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και σε κατανάλωση νερού συγκριτικά με το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, συγκεντρώνουν και κάποια περαιτέρω πλεονεκτήματα. Τα όσπρια έχουν την δυνατότητα να βελτιώνουν την ποιότητα του εδάφους, εφόσον μέσω της στερέωσης του αζώτου, οδηγούν σε μείωση της ανάγκης για χρήση λιπασμάτων αζώτου. Παράλληλα, συμβάλλουν ενισχύοντας την παραγωγή και μειώνοντας τις πιθανότητες ασθeneιών των καλλιεργειών, μέσω των συστημάτων της περιστροφικής περικοπής ή της εναλλαγής καλλιεργειών, ενώ ταυτόχρονα πωλούνται σε χαμηλές τιμές. Βέβαια, τα όσπρια συγκεντρώνουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, κατά την παραγωγή και διάθεσή τους υφίστανται πολλές φορές μεγάλες μεταβολές στην απόδοση των καλλιεργειών, οι οποίες είναι ευαίσθητες σε ακραίες περιβαλλοντικές επιδράσεις, έχουν μεγάλες απαιτήσεις για φώσφορο, ενώ παρατηρείται κερδοφορία μικρότερη από αντίστοιχες καλλιέργειες δημητριακών. [10]

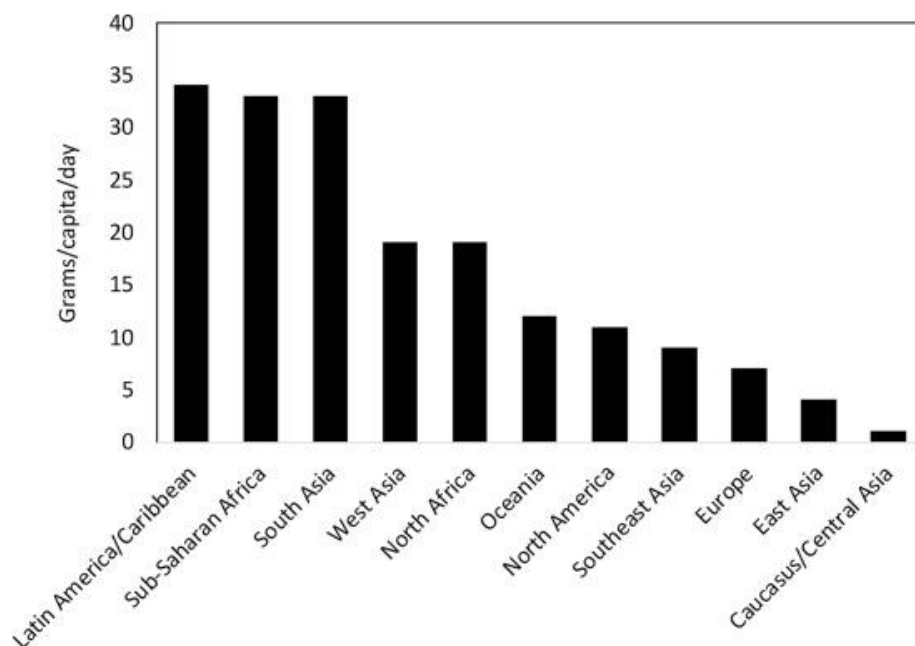
## 2.1 Όσπρια

Τα όσπρια είναι βρώσιμοι σπόροι της οικογένειας Leguminosae και είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών σπόρων περιλαμβάνοντας 600 γένη και περίπου 13.000 είδη. Ο όρος όσπριο (legume) προέρχεται από το λατινικό *legere*, που σημαίνει μαζεύω, μια αντιστοιχία για την συλλογή των σπόρων με το χέρι. Εναλλακτικά, τα όσπρια είναι γνωστά ως "pulses", από το λατινικό, *puls*, ένα δοχείο από γεύμα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, όσον αφορά τις καλλιέργειες οσπρίων, κυριαρχεί η σόγια, ενώ ακολουθούν το φιστίκι, τα ξηρά φασόλια, τα ξηρά μπιζέλια, τα ρεβίθια, *cowpea*, η φάβα, η φακή, περιστέρι, διάφορα άλλα φασόλια, το λούπινο και το φασόλι Bambara. [10]



Εικόνα 2: κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής οσπρίων από το 2014 έως το 2019 σε μετρικούς τόνους

Η μέση κατανάλωση οσπρίων, σε γραμμάρια κατά κεφαλήν ανά ημέρα, κυμαίνεται από 33-34 σε Λατινική Αμερική και Καραϊβική, Νότια Ασία και υποσαχάρια Αφρική, σε 1 σε Καύκασο και Κεντρική Ασία.



Εικόνα 3: μέση κατανάλωση οσπρίων κατά κεφαλήν ανά μέρα για διάφορες περιοχές (2011-2013)

Τα όσπρια αποτελούν μια από τις σημαντικότερες πηγές και υψηλότερης ποιότητας πρωτεΐνης στην ανθρώπινη διατροφή για εκατοντάδες χρόνια. Είναι φθηνά, διατίθενται σε όλον τον κόσμο και χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα από όλους σχεδόν τους ανθρώπους παγκοσμίως. Συναντώνται αρκετές αντιθέσεις γύρω από τις πολιτιστικές αντιλήψεις για τα όσπρια ανά τον κόσμο. Στην Ευρώπη και την Εγγύς Ανατολή, τα φασόλια ήταν παραδοσιακά η τροφή των φτωχών και συχνά αποκαλούνταν ως «το κρέας του φτωχού», αφού κυρίως οι πλούσιοι είχαν την οικονομική δυνατότητα να τρέφονται με κρέας και κατά συνέπεια να προσλαμβάνουν πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης. Ωστόσο, στην ανατολική Ασία, η τοπική κουζίνα βασίζεται αρκετά στην σόγια, ενώ επίσης στη Νότια Ασία και στην Κεντρική και Νότια Αμερική οι διατροφικές συνήθειες εμφανίζουν έντονα το στοιχείο των οσπρίων. Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι μετρίως έως αρκετά εύπεπτες από τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται πως οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι εύπεπτες σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με αυτές του βόειου κρέατος. Γενικότερα, εκτός της σόγιας, τα περισσότερα όσπρια χαρακτηρίζονται από έλλειψη στα αμινοξέα που εμπεριέχουν θείο και άλλα απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη. Το παραπάνω πρόβλημα μπορεί να καλυφθεί με την ταυτόχρονη κατανάλωσή των οσπρίων με δημητριακά, όπως το ρύζι, τα οποία είναι πλούσια σε θειούχα αμινοξέα και με τον τρόπο αυτόν μπορούν να προσληφθούν τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανθρώπινη διατροφή. Στα όσπρια εμφανίζονται, επίσης, κάποιοι αντιθρεπτικοί παράγοντες, όπως οι αναστολείς θρυψίνη και χυμοτρυψίνη, οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να ρυθμίζουν την πέψη των πρωτεϊνών. Ωστόσο, κατά τον βρασμό, το ψήσιμο ή την ζύμωση των οσπρίων περιορίζεται σημαντικά η ποσότητα των αντιθρεπτικών παραγόντων.

Όπως προκύπτει από πληθώρα μελετών σχετικά με την κατανάλωση τροφίμων, οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου αναμένεται να διπλασιαστούν μεταξύ 2010 και 2050. Μια δεδομένη αύξηση κατανάλωσης τροφών φυτικής προέλευσης θα μπορούσε να οδηγήσει στην μείωση του προσδόκιμου εκπομπών έως και 80%. Πιο συγκεκριμένα, το αποτύπωμα αερίων του θερμοκηπίου ανά 100 g πρωτεΐνης των οσπρίων είναι περισσότερο από 90% χαμηλότερη από τις αντίστοιχες εκπομπές που οφείλονται στην παραγωγή από βόειο κρέας και περισσότερο από 80% χαμηλότερες από αυτές που παράγονται από το αρνί και το πρόβειο κρέας. Τέλος, προβλέπεται πως μια ενδεχόμενη αλλαγή διατροφικών συνηθειών, κατά την οποία τα όσπρια θα αποτελούσαν την κύρια πηγή πρωτεϊνών, θα είχε και ευρύτερα οφέλη για τον πλανήτη, καθώς θα συνέβαλε ως έναν βαθμό στον έλεγχο της έξαρσης της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Επιπροσθέτως, σχετικά με την παγκόσμια υγεία, δεδομένου ότι τα σημερινά παγκόσμια πρότυπα ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης για έναν ενήλικα είναι 2.500 θερμίδες, μια διατροφή που βασίζεται στα όσπρια μπορεί να συνεισφέρει στην μείωση της παχυσαρκίας, μέσω της χαμηλότερης πρόσληψης θερμίδων και λιπαρών. Βέβαια, αν οι μερίδες και η ποσότητα φαγητού υπερβαίνουν τις 2.500 θερμίδες, τα περιβαλλοντικά οφέλη που απορρέουν από αυτήν την αλλαγή διατροφικών συνηθειών σίγουρα θα περιορίζονταν. [10], [11]

Επιπροσθέτως, η καλλιέργεια οσπρίων βοηθά στην αύξηση της γονιμότητας του εδάφους και την παραγωγικότητα των καλλιεργειών εμπλουτίζοντας το έδαφος με άζωτο. Τα όσπρια μπορούν και δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο στην κατάλληλη μορφή του, χρησιμοποιώντας κάποιες ειδικές περιοχές των ριζών τους, οι οποίες εξειδικεύονται στην συγκεκριμένη λειτουργία και περιέχουν συμβιωτικά βακτήρια ή ριζόβια. Αν και τα όσπρια χρησιμοποιούνταν συχνά σε συστήματα εναλλαγής καλλιεργειών ή περικοπής με καλλιέργειες δημητριακών, με την διαδεδομένη χρήση λιπασμάτων πλούσιων σε άζωτο, δεν αξιοποιούνται πλέον αρκετά για τους λόγους αυτούς. Σε μεγάλες καλλιέργειες, λόγω της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των οσπρίων και των ριζόβιων στις ρίζες των οσπρίων, υπολογίζεται ότι μπορούν να προκύψουν 21 μετρικοί τόνοι αζώτου ετησίως, εξοικονομώντας έτσι 8 έως 12 δισεκατομμύρια αμερικανικά δολάρια. Η

παρουσία των συμβιωτικών ριζόβιων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των οσπρίων και πολλές φορές ο εμβολιασμός του εδάφους με ριζόβια συνιστά βασική απαίτηση για την εξασφάλιση της υψηλής παραγωγικότητας των καλλιεργειών σε όσπρια. Επιπλέον, είναι αναγκαία η παρουσία φωσφόρου για τον ενεργειακό μετασχηματισμό στις ειδικές περιοχές των ριζών, ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση κατά την παραγωγή οσπρίων. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός καλλιεργειών οσπρίων με δημητριακά αυξάνει την αποτελεσματικότητα της χρήσης φωσφόρου. [12], [13], [14]

Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι καλλιέργειες δημητριακών, όπως το σιτάρι, το ρύζι, το κριθάρι, ο αραβόσιτος, η σίκαλη και η βρώμη αποτελούν μεγαλύτερες καλλιέργειες σε σχέση με τις αντίστοιχες των οσπρίων και συγκεκριμένα καλύπτουν τετραπλάσια έκταση καλλιεργήσιμης γης. Επιπλέον, οι καλλιέργειες δημητριακών υπερβαίνουν σε παραγωγή και απόδοση αυτήν των οσπρίων, κάτι που συνδέεται άμεσα με τις μεγαλύτερες βεληνεκούς επενδύσεις και την μεγαλύτερη τεχνογνωσία σε αγρονομικές πρακτικές για καλλιέργειες δημητριακών και τις νέες ποικιλίες που καλλιεργούνται. Τα τελευταία 20 χρόνια, οι εκτάσεις γης που αξιοποιούνται για την καλλιέργεια οσπρίων έχουν πληθύνει, με ορισμένες εξαιρέσεις όπως για το λούπινο και τα φασόλια, ενώ παρατηρείται άνοδος στην απόδοση για καλλιέργειες όπως αυτές της σόγιας, των φασολιών, της φακής και των ρεβιθιών με αποτέλεσμα την βελτίωση της συνολικής παραγωγής τους. Αντίθετα, η απόδοση των καλλιεργειών οσπρίων, όπως το φασόλι, σε φάρμες μικρής κλίμακας παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, εφόσον κυρίως οι μεγαλύτεροι παραγωγοί διαθέτουν μεγαλύτερη τεχνογνωσία και πρόσβαση σε καλύτερης ποιότητας σπόρους. Ο παγκόσμιος πληθυσμός υπολογίζεται να αυξηθεί σε 9-10 δισεκατομμύρια έως το 2050 και προκειμένου να καλυφθούν οι νέες δεδομένες πρωτεϊνικές ανάγκες, θα πρέπει να σημειωθεί περίπου 25% αύξηση για την συνολική παραγωγή οσπρίων, ώστε να διατηρηθεί η σημερινή πρότυπη ποσότητα κατανάλωσης οσπρίων του μέσου ανθρώπου. [10], [12]

Οι καλλιέργειες ορισμένων οσπρίων διακρίνονται για την ανθεκτικότητά τους στην ξηρασία και την δυνατότητά τους να ευδοκούν σε εδάφη, φτωχά σε θρεπτικά συστατικά. Οι καλλιέργειες οσπρίων συναντώνται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και υψομέτρων, από δροσερές και εύκρατες περιοχές, για περιπτώσεις οσπρίων σαν τις φακές, το λούπινο και τα ρεβίθια, έως θερμές υγρές τροπικές περιοχές, όπως το "φτερωτό" φασόλι. Στους περιορισμούς που σχετίζονται με την καλλιέργεια οσπρίων εντάσσονται μεγάλες διακυμάνσεις στην απόδοση, καταστροφές καλλιεργειών εξαιτίας της επίδρασης βιοτικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα κατά την παραγωγή "cowpea" στην Αφρική από έντομα ή αβιοτικών παραγόντων, όπως κατά την παραγωγή φακής στην Αυστραλία από τις δυσμενείς καιρικές συνθήκες. Στους παραπάνω περιορισμούς προστίθενται επιπλέον παράγοντες, όπως για παράδειγμα ο φαβισμός που σχετίζεται με την κατανάλωση φάβας, ενώ για την περίπτωση του φιστικιού υπάρχουν πιθανότητες αλλεργίας ή μόλυνση από αφλατοξίνες και η υψηλή περιεκτικότητα σε αλκαλοειδή του λούπινου. Πολλές ποικιλίες οσπρίων απαιτούν πολύ χρόνο μαγειρέματος, όπως και ειδική προετοιμασία αρκετό χρόνο πριν. Τέλος, παράγοντες που σχετίζονται με πολιτισμικά κριτήρια πολλές φορές δεν διευκολύνουν την κατανάλωση οσπρίων, όπως για παράδειγμα για ορισμένες ποιμενικές κοινότητες που έχουν διαμορφωθεί σε ξηρά περιβάλλοντα και βασίζονται αποκλειστικά στην κτηνοτροφία για την εξασφάλιση της τροφής τους. [10]

Οι άνθρωποι δεν έχουν ακόμα εκμεταλλευθεί τα όσπρια και τις δυνατότητες που μπορούν αυτά να προσφέρουν σε γενετικό επίπεδο. Η συλλογή λεπτομερών πληροφοριών γύρω από το γονιδίωμα των οσπρίων σε συνδυασμό με την γενετική ποικιλότητα των οσπρίων στις τράπεζες σπόρων μπορούν να ανοίξουν τον δρόμο για νέες σοβαρές επενδύσεις πάνω στην καλλιέργεια των οσπρίων. Παρόλο που για την περίπτωση του ρυζιού έχει πραγματοποιηθεί χαρτογράφηση

του γονιδιώματος από το 2005, αντίστοιχα ολόκληρες γονιδιακές αλληλουχίες έγιναν για πρώτη φορά διαθέσιμες για το φιστίκι και το μπιζέλι το 2019. Σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ οι αποδόσεις των καλλιεργειών δημητριακών έχουν σχεδόν τριπλασιαστεί τα τελευταία 50 χρόνια, οι συνολικές αποδόσεις των καλλιεργειών οσπρίων αυξήθηκαν μόνο κατά περίπου 60%. Η αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής για τον σχεδιασμό βελτιωμένων καλλιεργειών και της τεχνογνωσίας μεγάλων ιδρυμάτων θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ανάπτυξη ποικιλιών οσπρίων, πολύ περισσότερο ανθεκτικών στην ξηρασία και τις παθογένειες και με πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε θειούχα αμινοξέα. Συνεχώς γίνονται έρευνες, οι οποίες βασίζονται τόσο στους παραδοσιακούς τρόπους καλλιέργειας όσο και στις μεθόδους της γενετικής μηχανικής, οι οποίες θα μπορέσουν να συνεισφέρουν στην καλλιέργεια οσπρίων που θα χαρακτηρίζονται από αυξημένη περιεκτικότητα σε θειούχα αμινοξέα. Επίσης, εμφανίζονται γενετικά τροποποιημένα όσπρια, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι σε παράσιτα, όπως τα νηματώδη, αλλά και απέναντι σε έντομα. Τέλος, είναι σημαντικό να προσδιοριστούν οι βέλτιστοι παράγοντες και παράμετροι σχετικά με την συμβιωτική σταθεροποίηση του αζώτου στα οζίδια της ριζών των οσπρίων, ώστε να επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή διαλογή ποικιλιών οσπρίων και στελεχών ριζοβίων, με σκοπό την μεγαλύτερη απόδοση και ανθεκτικότητα απέναντι σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που θέτουν σε κίνδυνο τις καλλιέργειες. [10], [12]

Εν τέλει, μια αλλαγή δεδομένων στην διατροφή του ανθρώπου, σε παγκόσμια βάση, που θα συνδέεται με αυξημένη κατανάλωση οσπρίων θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από την μεγαλύτερη διαθεσιμότητα των ίδιων των οσπρίων ως προϊόντα, την ευαισθητοποίηση και την οικονομική προσβασιμότητα σε αυτά από τους καταναλωτές, αλλά και την ζήτηση συνολικά. Μέσα σε χρονικό διάστημα τριών δεκαετιών, το μέσο επίπεδο κατανάλωσης των οσπρίων, παγκοσμίως, διατηρήθηκε σταθερό και περίπου στα 21 g κατά κεφαλήν ανά ημέρα. Η καλλιέργεια οσπρίων είναι σημαντικό να υποστηρίζεται από επιπλέον οικονομικά κίνητρα έτσι ώστε να επιλέγεται έναντι άλλων, σχετικά πιο αποδοτικών καλλιεργειών. Σήμερα, ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής παραγωγής οσπρίων, όπως για την περίπτωση της σόγιας και του λούπινου, υποστηρίζει την βιομηχανία της κτηνοτροφίας, δηλαδή προορίζεται για τροφή των ζώων, τα οποία μετέπειτα θα αποτελέσουν τροφή για τον άνθρωπο. Γίνεται αντιληπτό πως η αξιοποίηση της σόγιας ως τροφή ζώων για την τελική παραγωγή κρέατος συνιστά μια μη αποδοτική χρήση ενός προϊόντος που εμπεριέχει πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας, το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα βασικό στοιχείο της διατροφής του ανθρώπου. Οι ανάγκες στον τομέα της κτηνοτροφίας καθορίζουν άμεσα τα επίπεδα στα οποία κινείται η σημερινή συνολική παραγωγή οσπρίων, όπως το λούπινο και η σόγια, ενώ δεν έχει γίνει συσχέτιση με το αν και πόσο μεγάλες μεταβολές μπορούν να υποστούν οι τιμές, η παραγωγή και το εμπόριο της σόγιας και του λούπινου, εφόσον πραγματοποιηθεί μελλοντική αλλαγή πλεύσης προς την αυξημένη ζήτηση σόγιας και λούπινου που θα προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. [10]

## 2.2 Ρεβίθι

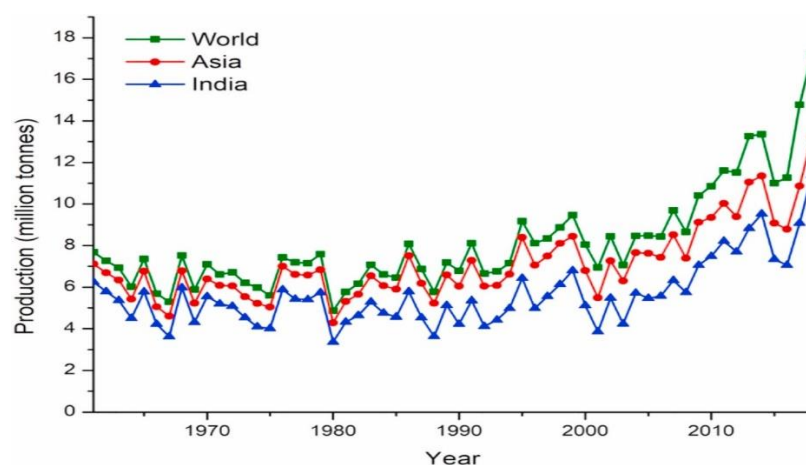
Το ρεβίθι (*Cicer arietinum* L.) είναι ένα όσπριο ευρέως διαδεδομένο σε ολόκληρο τον κόσμο. Συναντάται με πολλά διαφορετικά ονόματα ανά τις χώρες του κόσμου. Οι καλλιέργειες ρεβιθιών θεωρείται πως προέρχονται από την Τουρκία, με βάση την ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης των σπόρων. Η εξάπλωση του ρεβιθιού έγινε μέσω του «δρόμου του μεταξιού» προς τη Δύση και το Νότο ταυτόχρονα με την μετανάστευση των ανθρώπων. Οι καλλιέργειες των ρεβιθιών είναι ανθεκτικές απέναντι στην ξηρασία και λόγω αυτού δεν έχουν τις ίδιες ανάγκες για άρδευση σε σχέση με άλλες καλλιέργειες, ενώ επίσης έχουν την δυνατότητα να ευδοκίμουν σε περιοχές όπου

οι βροχοπτώσεις είναι σπάνιες. Η αγορά τροφίμων προσανατολίζεται πλέον κυρίως στην παραγωγή ασφαλών προϊόντων και την κάλυψη των αναγκών πρόσληψης πρωτεϊνών από βιώσιμες πηγές, ενώ ταυτόχρονα μεγάλο ποσοστό των πληθυσμών τώρα στρέφονται προς μια βίγκαν δίαιτα, συνεπώς η βιομηχανία εξερευνά συνεχώς νέες εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα το ρεβίθι, το οποίο συνιστά μια φθηνή τροφή, πλούσια σε περιεχόμενο πρωτεΐνης (20–22%). [15]

Κάθε είδος σπόρου ρεβιθιού μπορεί να διακρίνεται από διαφορετικό μέγεθος, σχήμα και χρώμα. Δεδομένων, λοιπόν, αυτών των διαφορών, τα ρεβίθια κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες έχουν χαρακτηριστικά ονόματα «Kabuli» και «Desi». Όσον αφορά τον τύπο Kabuli, τα συγκεκριμένα ρεβίθια χαρακτηρίζονται από μια λεπτή επικάλυψη σπόρου, η οποία μπορεί να εμφανίζει χρώμα από λευκό έως cream, με μια ποσότητα 100 σπόρων να ζυγίζει 28-70g. Τα ρεβίθια τύπου Desi, διαθέτουν σπόρους με παχύτερο (δέρμα) και με ακανόνιστο σχήμα φλοιού που μπορεί να εμφανιστεί με μια ποικιλία χρωμάτων από κρέμα, μαύρο, καφέ, κίτρινο και πράσινο, ενώ σε αυτόν εμπεριέχεται και ανθοκυανίνη. Οι καλλιέργειες για τον τύπο Kabuli ευδοκίμουν σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, ενώ για τις αντίστοιχες του τύπου Desi είναι προτιμότερες οι ημιάνυδρες τροπικές περιοχές. [15]

### 2.2.α Παραγωγή

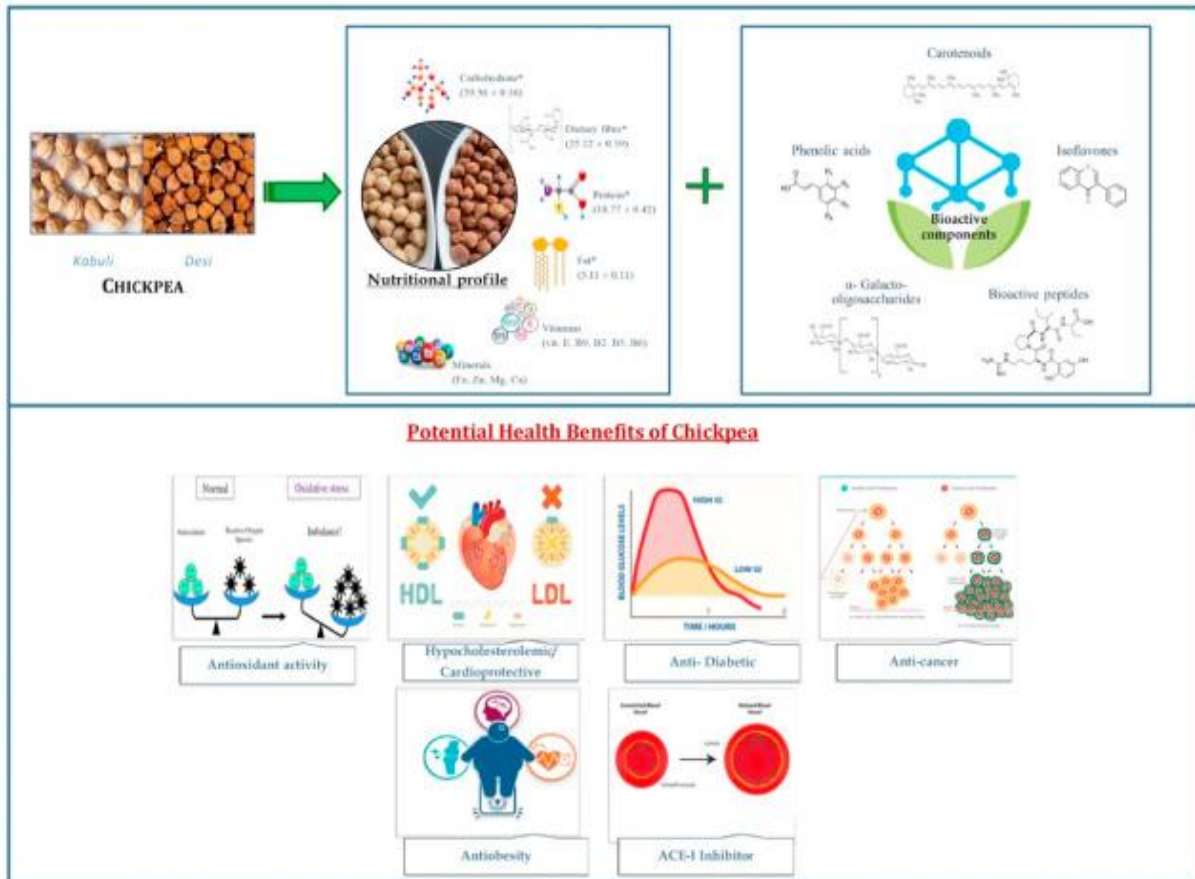
Η Ινδία είναι η χώρα, στην οποία εμφανίζεται η μεγαλύτερη παραγωγή ρεβιθιών στον κόσμο με ποσοστό περίπου 66,19%, ακολουθούμενη από Αυστραλία και Τουρκία, ενώ συνιστά το 86,03% σε ποσοστιαία βάση της συνολικής παραγωγής ρεβιθιού στην Ασία. Οι καλλιέργειες ρεβιθιού αποτελούν την δεύτερη σε σειρά πιο διαδεδομένη καλλιέργεια παγκοσμίως μετά από αυτήν των κοινών φασολιών. Σύμφωνα με καταγραφή, η οποία έγινε το 2018, η συνολική έκταση γης που καταλαμβάνεται από τις καλλιέργειες οσπρίων στον κόσμο ήταν 95,76 εκατομμύρια εκτάρια, εκ των οποίων 17,81 εκατομμύρια εκτάρια καλύπτονται από καλλιέργειες ρεβιθιού. Σε παγκόσμιο επίπεδο η παραγωγή ρεβιθιού το 2018 ήταν 17,19 εκατομμύρια τόνοι εκφράζοντας το ποσοστό του 18,63% της συνολικής παραγωγής οσπρίων. Η Ινδία συνεισφέρει το 27,53% της συνολικής παγκόσμια παραγωγής οσπρίων και 59,67% στην παραγωγή οσπρίων της Ασίας. [15]



Εικόνα 4: διακύμανση της συνολικής παραγωγής ρεβιθιού ανά τα χρόνια σε Ινδία, Ασία και ολόκληρο τον κόσμο

## 2.2.β περιεχόμενο ρεβιθιού και οφέλη για την υγεία

Η κατανάλωση ρεβιθιού συνδέεται κυρίως με τους ξηρούς σπόρους του, οι οποίοι έχουν υψηλή θρεπτική αξία, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Επιπλέον αποτελεί μια καλή πηγή υδατανθράκων, φυτικών ινών, μετάλλων, βιταμινών και πολλών βιοδραστικών συστατικών, ενώ έχει ιστορικά χαρακτηριστεί ως “κρέας του φτωχού”. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, τα οποία απορρέουν από την τακτική κατανάλωση οσπρίων. [15]



Εικόνα 5: οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση ρεβιθιού

### 2.2.β.1 Πρωτεϊνικό περιεχόμενο:

Το ρεβίθι είναι χαρακτηρίζεται από υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και αποτελεί μια σχετικά φθηνή πηγή πρωτεΐνης, όντας διαθέσιμο για τους ανθρώπους των οικονομικά ασθενέστερων τάξεων, αλλά και για τους χορτοφάγους. Η πρωτεΐνη ρεβιθιού διακρίνεται από πολύ υψηλά επίπεδα βιοδιαθεσιμότητας και το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών, αυτών, αποτελούν οι σφαιρίνες. Από την άλλη, όσον αφορά τα θειούχα αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη και κυστεΐνη, οι σπόροι ρεβιθιού παρουσιάζουν έλλειψη, ενώ είναι πλούσια σε λυσίνη και αργινίνη. Αντίθετα, τα δημητριακά παρουσιάζουν περίσσεια σε αμινοξέα που περιέχουν θείο, με την λυσίνη να περιέχεται σε περιορισμένο βαθμό. Για τους παραπάνω λόγους σε πολλές περιοχές του κόσμου, όσπρια και δημητριακά καταναλώνονται μαζί, όπως στην Ινδία, όπου είναι το περισσότερο διαδεδομένο. Ο συνδυασμός δημητριακών με όσπρια συνεισφέρει στην διαμόρφωση ενός πιο ολοκληρωμένου προφίλ προσλαβανόμενων συνολικά αμινοξέων και κατά συνέπεια την σύνθεση πρωτεϊνών υψηλότερης ποιότητας. Συγκριτικά, το ρεβίθι της ποικιλίας Kabuli έχουν υψηλότερη πεπτικότητα πρωτεΐνης σε σχέση με την αντίστοιχη ποικιλία Desi και in vitro πεπτικότητα των πρωτεϊνών κυμαίνεται από 34 έως 76%. Οι πρωτεΐνες των ρεβιθιών τύπου Kabuli και Desi

παρουσίασαν μεγάλη περιεκτικότητα στα αμινοξέα Ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ και αργινίνη και η ποσότητα αμινοξέων που περιέχουν θείο σε αυτά τα δείγματα αναφέρθηκε ότι ήταν 2,11 και 2,20 g / 100 g, αντίστοιχα. Η χρήση του ενζύμου πεψίνη για την παραγωγή των προϊόντων υδρόλυσης στα οποία εμπεριέχεται πρωτεΐνη ρεβιθίου, χαρακτηρίζεται από αντιοξειδωτική δράση και τις ανασταλτικές ιδιότητες του ενζύμου ACE (ένζυμο μετατροπής αγγειοτασίνης-I). Η ανασταλτική δράση του ενζύμου ACE έγκειται στο γεγονός πως συνδέεται άμεσα με την μείωση της συχνότητας της υπέρτασης, συνεπώς εμποδίζεται η υδρόλυση της αγγειοτασίνης I προς διαμόρφωση της αγγειοτενσίνης II, η οποία προσκολλάται με διάφορους κυτταρικούς υποδοχείς, οι οποίοι σηματοδοτούν αγγειοσυστολή και συνεπώς οδηγούν σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Τα πεπτίδια που εμπεριέχονται στα ρεβίθια συγκεντρώνουν έναν αριθμό από βιοδραστικές ιδιότητες και μεταξύ αυτών η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιυπερτασική, αντικαρκινική, αντιμυκητιακή δράση τους, ενώ επίσης συμβάλλουν κατά της παχυσαρκίας και της χοληστερίνης με ταυτόχρονη υπογλυκαιμική δραστηριότητα.

Η πρωτεΐνη ρεβιθίου υπερέχει έναντι των αντίστοιχων πρωτεϊνών άλλων οσπρίων, όπως της σόγιας ή του μπιζελιού, ως προς τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

- Θερμική διαστολή
- Αφρισμό
- Σταθερότητα
- Σταθερότητα γαλακτώματος

Οι παραπάνω χαρακτηριστικές ιδιότητες της πρωτεΐνης ρεβιθίου την καθιστούν ιδανική για την προσθήκη σε ψωμί. Πέρα από τον εμπλουτισμό των διατροφικών συστατικών του τελικού προϊόντος, η προστιθέμενη πρωτεΐνη ρεβιθίου συμβάλλει και στην αύξηση του ειδικού όγκου του παραγόμενου ψωμιού. [15]

#### *2.2.β.ΙΙ Περιεχόμενο σε υδατάνθρακες :*

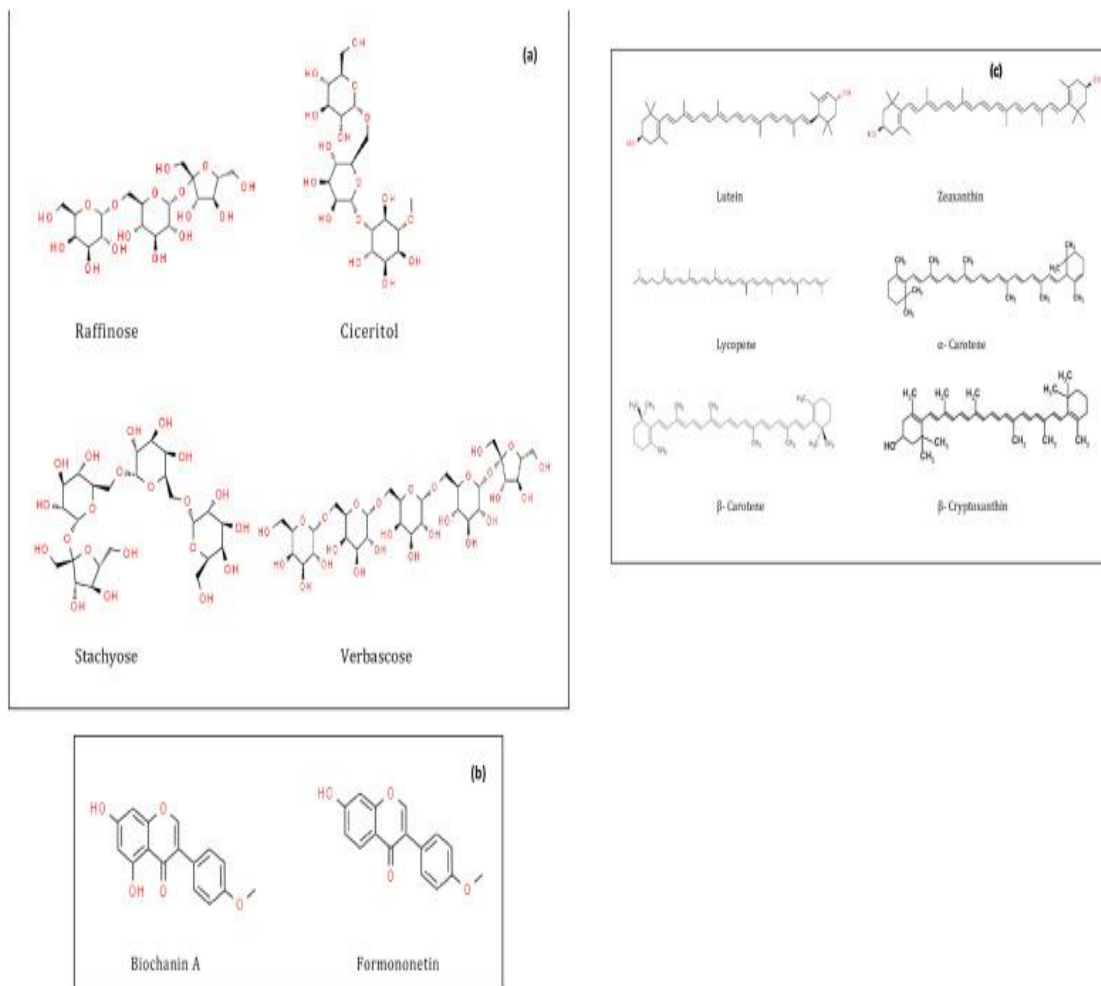
Ο σπόρος του ρεβιθίου εμπεριέχει υδατάνθρακες σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 60 με 65 %. Τα όσπρια χαρακτηρίζονται από μια ελαφρώς χαμηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες συγκριτικά με την αντίστοιχη των δημητριακών. Οι υδατάνθρακες που εμπεριέχονται στο ρεβίθι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους διαθέσιμους και τους μη διαθέσιμους υδατάνθρακες. Ως διαθέσιμοι χαρακτηρίζονται οι υδατάνθρακες, αυτοί, των οποίων η πέψη είναι εφικτή με ενζυματική δράση στο λεπτό έντερο και αποτελούνται από μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη) και δισακχαρίτες ( σουκρόζη, μαλτόζη). Στην κατηγορία των μη διαθέσιμων υδατανθράκων εντάσσονται ολιγοσακχαρίτες (ραφφινόζη, σταχυόζη, βερμπασκόζη και σισσεριτόλη), ανθεκτικό άμυλο, πηκτίνη, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη. Αντίθετα με τους διαθέσιμους υδατάνθρακες, η πέψη των μη διαθέσιμων δεν είναι δυνατή στο λεπτό έντερο. [15]

Ο πολυσακχαρίτης που εμπεριέχεται στους σπόρους των ρεβιθιών και κυμαίνεται από 30,8 έως 37,9% σε ξηρή βάση, είναι το άμυλο. Το άμυλο του ρεβιθίου έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη, ένα σάκχαρο το οποίο είναι υπεύθυνο για το υψηλότερο ποσοστό οπισθοδρόμησης και κατά συνέπεια μείωση του γλυκαιμικού δείκτη, καθώς το άμυλο γίνεται ανθεκτικό προς ενζυματική αποδόμηση, με τον γλυκαιμικό δείκτη να μετριέται 49,8 στην αντίστοιχη κλίμακα. Ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης του αμύλου ρεβιθίου οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά του σε αμυλόζη και το ανθεκτικό άμυλο. Το ανθεκτικό άμυλο παρουσιάζει παρόμοια δράση με αυτή των φυτικών ινών καθώς καταφέρνει έχοντας καταλήξει στο παχύ έντερο, να μην έχει υποστεί υδρόλυση και να μην έχει απορροφηθεί από τον οργανισμό με την πέψη. Οδηγεί σε παραγωγή μεθανίου, διοξειδίου του άνθρακα και λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA), τα οποία είναι ουσιαστικά τα προϊόντα της μικροβιακής του ζύμωσης, ενώ επιπλέον δρα ως προβιοτικό. Ο



μετεωρισμός που προκαλείται από τα ρεβίθια είναι κυρίως το αποτέλεσμα της παρουσίας και της μικροβιακής ζύμωσης των ολιγοσακχαριτών, η οποία λαμβάνει χώρα στο παχύ έντερο. [15]

Το ρεβίθι περιέχει κατά κύριο λόγο ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα της α-γαλακτοζιδάσης( μονομερή γαλακτόζης ενωμένα με α-D-1,6 συνδέσεις). Συγκεκριμένα, οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν από την σακχαρόζη είναι η ραφινόζη, η βερμπασκόζη και η σταχυόζη. Οι ολιγοσακχαρίτες μελιβιόζη και μαννινοτριόζη εντάσσονται στους γαλακτοσίδες γλυκόζης και αντίστοιχα οι ολιγοσακχαρίτες ακτοπινιτόλη, γαλακτινόλη και σισεριτόλη στους γαλακτοσίδες ινσολιτόλης. Η σισεριτόλη είναι ο ολιγοσακχαρίτης, ειδικότερα τρισακχαρίτης, που συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο ρεβίθι. [15]



Εικόνα 6: χημικοί τύποι α)γαλακτοολιγοσακχαριτών β) ισοφλαβονών και γ) καροτενοειδών που συναντώνται στο ρεβίθι

### 2.2.β.ΙΙ.α: GOS στους σπόρους ρεβιθιού

Παραπάνω ανάλυση των χαρακτηριστικών των γαλακτοολιγοσακχαριτών, καθώς στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας γίνεται προσπάθεια απομόνωσης τους.

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες συμπεριλαμβάνονται και στις φυτικές ίνες και συγκεκριμένα στις διαλυτές φυτικές ίνες, όπως αποδεικνύεται από τις χημικές μετρήσεις φυτικών ινών για τις συνολικές φυτικές ίνες (TDF) και από τις φυσιολογικές τους επιδράσεις.[16], [17]

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (α-GOS) χαρακτηρίζονται από χαμηλό μοριακό βάρος και είναι σάκχαρα, τα οποία συναντώνται ευρέως στους φυτικούς οργανισμούς, ενώ διαλύονται εύκολα στο νερό, καθώς και σε διαλύματα νερού με αλκοόλη. Τα συγκεκριμένα σάκχαρα συναντώνται σε μεγάλες αναλογίες στα όργανα αποθήκευσης των φυτών, όπου και συμβάλλουν σε φυσιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται άμεσα με την ανοχή στην ξηρασία και τον παγετό, καθώς και κατά τις συνθήκες ξηρασίας με την αναστολή βλάστησης. Συγκεκριμένα, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που εμφανίζονται με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους σπόρους ρεβιθιού είναι αρχικά η σισσεριτόλη, ακολουθεί η σταχυόζη, έπειτα κατά σειρά η ραφφινόζη και η βερμπασκόζη, με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αυτών να κυμαίνονται από 4,18% έως 8,53%. Στον παρακάτω πίνακα, εμφανίζονται ενδεικτικά οι παρατηρούμενες συγκεντρώσεις του καθενός εκ των α-GOS στους σπόρους των ρεβιθιών.

Πίνακας 1: περιεχόμενο α-γαλακτοολιγοσακχαριτών στους σπόρους ρεβιθιού

<b>a-GOS</b>	<b>Περιεχόμενο (g/ 100 g)</b>
σισσεριτόλη	2.69-4.04
σταχυόζη	1.14-2.56
ραφφινόζη	0.32-1.45
βερμπασκόζη	0.03-0.48

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, αφού είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την ανάπτυξη των bifidobacteria στο έντερο. Κατά την διαδρομή τους μέχρι το παχύ έντερο δεν έχουν αφομοιωθεί και εκεί είναι που λειτουργούν ως υποστρώματα για την εντερική ζύμωση, η οποία συμβάλλει καθοριστικά στην αύξηση του πληθυσμού των bifidobacteria στο έντερο. Η έλλειψη του ενζύμου της α-γαλακτοζιδάσης στο πάνω μέρος της ανθρώπινη εντερικής διαδρομής, είναι το χαρακτηριστικό αυτό που επιτρέπει να συμβούν τα παραπάνω. Με αυτόν τον τρόπο δηλαδή, οι α-γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορούν να θεωρηθούν ως προβιοτικά, όπως για παράδειγμα και το ανθεκτικό άμυλο και συνεπώς γίνονται αντιληπτά τα οφέλη που απορρέουν για την υγεία του παχέος εντέρου από την κατανάλωσή τους. Τα bifidobacteria διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για την άμυνα του οργανισμού, καθώς βοηθούν στον περιορισμό της ανάπτυξης παθογόνων μικροβίων και άλλων τοπικών επιβλαβών μικροχλωρίδων.

Τα παραπάνω επιτυγχάνονται χάρη στην παραγωγή από τα βακτήρια, αυτά, λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) κυρίως οξικό οξύ και γαλακτικό οξύ σε γραμμομοριακή αναλογία 3: 2, με την ταυτόχρονη απελευθέρωση διαφόρων αντιβιοτικών.

Τα SCFA συμμετέχουν ενεργά σε μια σειρά από λειτουργίες, οι οποίες εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του παχέος εντέρου. Αναφορικά οι ενέργειες που επιτελούν είναι:

- Η εξασθένηση των προκύπτουσων φλεγμονών
- Η αποτροπή από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του εντέρου
- Η αντικαρκινική δράση τους
- Η εμπόδιση της παραγωγής αζωτούχων μεταβολιτών
- Η διαφύλαξη από τον αποικισμό παθογόνων

Επιπλέον, η απελευθέρωση των SCFA οδηγεί στην οξίνιση του αυλού του παχέος εντέρου, κάτι το οποίο έχει σαν συνέπεια την αυξημένη εμφάνιση μεταλλικών στοιχείων, και περισσότερο για το ασβέστιο Ca και το μαγνήσιο Mg. Η δράση των SCFA αφορά και τον μεταβολισμό των λιπιδίων και συνεπάγεται μείωση στην συγκέντρωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) χοληστερόλης.

Είναι σημαντική η ύπαρξη μέτρου όσον αφορά τις ποσότητες πρόσληψης των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Σε περίπτωση αυξημένης κατανάλωσης α-GOS, όπως για παράδειγμα με μία προσλαμβανόμενη ποσότητα μεγαλύτερη από 3g ανά ημέρα, είναι αρκετά πιθανό να προκληθούν συνέπειες, οι οποίες να υπερκαλύπτουν τα όποια πλεονεκτήματα απορρέουν γενικά από την κατανάλωσή τους. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η εντατική μικροβιακή ζύμωση στο κατώτερο σημείο της εντερικής οδού οδηγεί στον μεταβολισμό των α-GOS προς την διαμόρφωση και απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα, υδρογόνου, μεθανίου και SCFA, τα οποία, τέλος, οδηγούν στην μείωση του pH στην περιοχή. Με την παραγωγή αερίων συνδέονται περισσότερο η ραφφινόζη, η σταχυόζη και η βερμπασκοζή εκ των γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Όταν μεγάλες ποσότητες αυτών των γαλακτοολιγοσακχαριτών συσσωρεύονται στο κατώτερο σημείο της εντερικής οδού, προκαλώντας μετεωρισμό, ταυτόχρονα μπορούν να προκύψουν και περαιτέρω συνέπειες, όπως για παράδειγμα διάρροια και κράμπες στην κοιλιακή χώρα. Επιπλέον, μπορεί να μην αξιοποιηθεί ολόκληρη η ενέργεια, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα τροφής που καταναλώνεται, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να επηρεάσουν την φύση και άλλων θρεπτικών συστατικών. Σε τελική ανάλυση, η πρόκληση μετεωρισμού αποτελεί τον παράγοντα που τις περισσότερες φορές αποτρέπει τους ανθρώπους από την κατανάλωση ρεβιθίων και γενικότερα οσπρίων. Τα ρεβίθια και οι φακές είναι τα όσπρια, τα οποία διαθέτουν τις μικρότερες αναλογικά ποσότητες των γαλακτοολιγοσακχαριτών που μπορούν να οδηγήσουν στις διαταραχές που περιγράφηκαν παραπάνω, καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα σισσεριτόλης, η οποία σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εκ των γαλακτοολιγοσακχαριτών υδrolύεται με πολύ μικρότερους ρυθμούς από την α-γαλακτοζιδάση.

Οι παράγοντες, αυτοί που προκαλούν μετεωρισμό είναι δυνατό να περιοριστούν με την κατάλληλη σε κάθε περίπτωση επεξεργασία. Τέτοιες μέθοδοι επεξεργασίας είναι οι ακόλουθες:

- Μαγείρεμα
- Βλάστηση
- Ζύμωση
- Προσθήκη του ενζύμου α-γαλακτοζιδάσης
- Εμποτισμός σε νερό

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, όντας υδατοδιαλυτοί, μπορούν να απομακρυνθούν στον ικανοποιητικό βαθμό, ύστερα από εμποτισμό των ρεβιθιών στο νερό και εν συνεχεία απορρίπτοντάς το, πριν από το μαγείρεμα για την τελική τους κατανάλωση. Η παραπάνω διαδικασία είναι αρκετά διαδεδομένη, ενώ η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από έναν αριθμό από παραμέτρους. Μερικοί από αυτούς είναι η αναλογία του προστιθέμενου νερού προς τους σπόρους, την θερμοκρασία, τον χρόνο που θα αφεθούν τα όσπρια στο νερό, την προσθήκη αλατιού στο νερό, καθώς και το είδος των οσπρίων. [18]

### *2.2.β.ΙΙΙ Περιεχόμενο σε φυτικές ίνες*

Σε κάθε τροφή φυτικής προέλευσης περιλαμβάνονται οι φυτικές ίνες. Οι φυτικές ίνες, λοιπόν συνιστούν το διατροφικό στοιχείο των φυτικών τροφών, το οποίο είτε παραμένει άπεπτο ή το στοιχείο του οποίου η πέψη δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί σε πλήρη βαθμό από το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα. [15]

Οι φυτικές ίνες στο σύνολό τους συμπεριλαμβάνουν ένα μείγμα άπεπτων πολυσακχαριτών (π.χ. κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, ολιγοσακχαρίτες, πηκτίνες, ούλα), λιγνίνη και κερία. Πρόσφατα, δόθηκε ένας πολύ αντιπροσωπευτικός ορισμός των φυτικών ινών από την Αμερικανική Ένωση Χημικών Δημητριακών.

Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, οι φυτικές ίνες είναι τα βρώσιμα μέρη φυτών , ανάλογα υδατανθράκων, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην πέψη και την απορρόφησή τους από το ανθρώπινο έντερο και υφίστανται πλήρη ή μερική ζύμωση στο παχύ έντερο. Με τον όρο φυτικές ίνες περιγράφονται πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, λιγνίνη, και παρεμφερείς φυτικές ουσίες. Η φυτικές ίνες επιτελούν διάφορες ευεργετικές λειτουργίες για το ανθρώπινο σώμα λειτουργώντας ως φυσικό καθαρτικό, ενώ συμβάλλουν στην μείωση της χοληστερόλης αλλά και των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. [18]

Οι φυτικές ίνες διαιρούνται σε δύο βασικές κατηγορίες, τις διαλυτές και τις αδιάλυτες φυτικές ίνες. Οι διαλυτές φυτικές ίνες διασπώνται με αργούς ρυθμούς στο έντερο, σε αντίθεση με τις αδιάλυτες φυτικές ίνες, οι οποίες δεν λαμβάνουν μέρος σε καμία μεταβολική διεργασία. Οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες, παρότι είναι μεταβολικά αδρανείς, εξυπηρετούν πολύ σημαντικές λειτουργίες καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά την περισταλτική κίνηση του εντέρου και μέσω της μικροβιακής ζύμωσης που υφίστανται συμβάλλουν τα μέγιστα στην ανάπτυξη των πληθυσμών βακτηρίων που διαμορφώνονται στο εσωτερικό του εντέρου και επιτελούν πολύ σημαντικές λειτουργίες. [18]

Οι διαλυτές φυτικές ίνες σχετίζονται με την ρύθμιση της γλυκόζης και των λιπιδίων στο αίμα. Η αυξημένη κατανάλωση των διαλυτών φυτικών ινών, σύμφωνα με μια σειρά από επιστημονικά δεδομένα, συνδέεται με σημαντική μείωση των πιθανοτήτων για καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) και μεταβολικού συνδρόμου, εφόσον με τις φυσιολογικές τους λειτουργίες δρουν κατά των αντίστοιχων παραγόντων. [18]

Συγκριτικά, μεταξύ των δύο βασικών ποικιλιών ρεβιθιού Desi και Kabuli, το περιεχόμενο σε διαλυτές και αδιάλυτες φυτικές ίνες στα ρεβίθια της ποικιλίας Desi είναι υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο της ποικιλίας Kabuli. Το παραπάνω δικαιολογείται λόγω του γεγονότος ότι τα ρεβίθια του τύπου Desi εμφανίζουν σπόρους με μεγαλύτερο σχετικά φλοιό . Οι διαλυτές και αδιάλυτες διαιτητικές ίνες, οι οποίες εμπεριέχονται στο ρεβίθι εκφράζονται σε ποσοστιαία βάση περίπου 1,42 και 27,84%, αντίστοιχα. Όσον αφορά την περίπτωση κατά την οποία οι σπόροι ρεβιθιού υφίστανται επεξεργασία, ώστε να διατεθούν στην αγορά με την μορφή αλευριού, η

αναλογία διαλυτών και αδιάλυτων διαιτητικών ινών σε κάθε αλεύρι είναι διαφορετική ανάλογα με την εκάστοτε μέθοδο επεξεργασίας που χρησιμοποιείται.

Σε κάποια βλαστημμένα μπιζέλια σημειώθηκε μείωση στην αναλογία αδιάλυτων προς διαλυτών φυτικών ινών, ενώ ταυτόχρονα με την μεταβολή αυτή της αναλογίας παρατηρείται και ποσοτική μεταβολή συνολικά για τις φυτικές ίνες, διαλυτές και αδιάλυτες. Προκύπτει, λοιπόν, ότι η αύξηση στις διαλυτές φυτικές ίνες έγινε με μεγαλύτερους ρυθμούς σε σύγκριση με τις αδιάλυτες φυτικές ίνες. Επίσης, η τεχνική του μαγειρέματος με εξώθηση προσφέρει την δυνατότητα τροποποίησης των αδιάλυτων σε διαλυτές φυτικές ίνες, λόγω της μέτριας διαλυτοποίησης των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος.

Σε δικοτυλήδονα φυτά, το κυτταρικό τοίχωμα περιλαμβάνει πολυσακχαρίτες όπως οι ξυλογλυκάνες ή αλλιώς ημικυτταρίνες, ομογαλακτουρονόνη και ραμνογαλακτουρονάνη, η οποία αποτελεί πηκτική ουσία. Τα όσπρια περιέχουν μια σημαντική ποσότητα α-γαλακτοολιγοσακχαριτών που ανήκουν κυρίως στην οικογένεια της ραφινόζης που περιλαμβάνει ραφινόζη, βερμπασκόζη και σταχυόζη. [15]

#### *2.2.β.IV Περιεχόμενο σε λίπη*

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά των ακατέργαστων σπόρων γραμμαρίων της Βεγγάλης κυμαίνεται από 2,70 έως 6,48% . Οι μικρές διακυμάνσεις στις τιμές της περιεκτικότητας σε λιπαρά αναφέρονται από διαφορετικούς ερευνητές ως 2,05 g / 100 g ,2,90-7,42 g / 100 g και 3,80-10,20 g / 100 g .

Γενικότερα, όσπρια όπως το μπιζέλι, η φακή, το φασόλι και το κόκκινο φασόλι χαρακτηρίζονται από περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της τάξεως των 1,64, 1,06, 1,15 και 1,06 g ανά 100 g αντίστοιχα. Τα παραπάνω όσπρια εμφανίζουν μικρότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα συγκριτικά με αυτή του ρεβιθιού, η οποία αντιστοιχεί σε 6,04 g ανά 100 g. Τα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ρεβίθι διακρίνονται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) σε μια αναλογία που αντιστοιχεί στο 66% και σε μικρότερα ποσοστά ακολουθούν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), τα οποία καταλαμβάνουν το 19% και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) σε ένα ποσοστό περίπου 15%. Συγκεκριμένα, το λιπαρό οξύ που συναντάται κατά κύριο λόγο στο ρεβίθι είναι το λινελαϊκό οξύ με ποσοστό 51,2%, ενώ το αμέσως επόμενο επικρατέστερο είναι το ελαϊκό οξύ (32,6%). Πληροφοριακά, σε άλλα όσπρια όπως τα φασόλια, τα μπιζέλια και φακές παρατηρείται μικρότερη ποσότητα λινελαϊκού οξέος, αλλά και ελαϊκού οξέος με τιμές αντίστοιχα για το λινελαϊκό οξύ 46,7, 45,6 και 44,4% και ομοίως 28,1, 23,2 και 20,9% ελαϊκό οξύ. Τέλος, στους ιστούς, λόγω του μεταβολισμού του λινελαϊκού οξέος επιτυγχάνεται η παραγωγή προσταγλανδινών, μιας ορμόνης συμβάλλει καθοριστικά μείωση της αρτηριακής πίεσης, καθώς και στην συσταλτική λειτουργία των λείων μυών. [15]

#### *2.2.β.V Περιεχόμενο σε μέταλλα και βιταμίνες*

Πέρα από το πλούσιο περιεχόμενό του σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες, το ρεβίθι αποτελεί πηγή βιταμινών και μετάλλων συνιστώντας, έτσι, μια τροφή υψηλής ποιότητας. Το ρεβίθι παρέχει σίδηρο, ψευδάργυρο, μαγνήσιο και ασβέστιο σε ποσότητες της τάξεως των 5,0 mg, 4,1 mg, 138 mg και 160 mg ανά 100 g ακατέργαστων σπόρων, αντίστοιχα. Η ημερήσια αναγκαία ποσότητα πρόσληψης σιδήρου και ψευδαργύρου ενός μέσου ανθρώπου μπορούν να καλυφθούν με κατανάλωση 100 g ρεβιθιών, ενώ 200 γραμμάρια ρεβιθιών μπορούν να ικανοποιήσουν τις απαιτούμενες ποσότητες πρόσληψης του ανθρώπου σε μαγνήσιο . Αναφορικά για τις δύο βασικότερες ποικιλίες ρεβιθιών Desi και Kabuli συγκρίνεται η περιεκτικότητά τους σε ασβέστιο. Τα ρεβίθια ποικιλίας Desi έχουν υψηλότερο ποσοστό ασβεστίου σχετικά με τα αντίστοιχα του

τύπου Kabuli. Όσον αφορά, βέβαια, τον σίδηρο υπάρχουν άλλα είδη οσπρίων, όπως οι φακές και τα φασόλια, διαθέτουν, σε σχέση με το ρεβίθι μεγαλύτερο περιεχόμενο σιδήρου.

Στους σπόρους του ρεβιθιού εμπεριέχονται αρκετά μεγάλες ποσότητες βιταμίνης E (τοκοφερόλη), καθώς και βιταμίνης B9 (φολικό οξύ). Αναφορικά, για τις δύο κυριότερες ποικιλίες ρεβιθιού, οι ενδεικτικές ποσότητες για τις δύο βιταμίνες είναι 11,2 και 206,5 mg / 100 g για τα ρεβίθια τύπου Desi, ενώ για την ποικιλία Kabuli 12,9 και 299,0 mg / g αντίστοιχα. Σε μικρότερο βαθμό, βιταμίνες του συμπλέγματος B, κυρίως βιταμίνης B2 (ριβοφλαβίνη), B5 (παντοθενικό οξύ) και B6 (πυριδοξίνη), εμφανίζονται επίσης στα ρεβίθια, σε ποσότητες της τάξεως των 0,21, 1,01, και 0,30 mg / 100 g αντίστοιχα για τα ρεβίθια του τύπου Desi και 0,26, 1,02 και 0,38 mg / 100 g για αυτά του τύπου Kabuli.

Στην Ινδία, οι καλλιέργειες ρεβιθιού αποδίδουν σπόρους με συγκεντρώσεις σε σίδηρο και ψευδάργυρο, οι οποίες παρουσιάζουν ένα εύρος τιμών από 4,9 έως 5,0 mg / 100 mg και 2,0-2,7 mg / 100 gm αντίστοιχα. Άλλες ποικιλίες ρεβιθιών, οι οποίες συναντώνται σε καλλιέργειες στην Βόρεια Αμερική παρουσιάζουν περιεχόμενο σε σελήνιο από 15,3 έως και 56,3μg / 100 mg. Σε τελική ανάλυση, για κάθε είδος ρεβιθιού, το διάφορα μικροθρεπτικά συστατικά και οι χαρακτηριστικές τους ποσότητες, σε κάθε περίπτωση είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την μορφή του γονότυπου του ρεβιθιού. [15]

#### *2.2.β.ν Περιεχόμενο σε βιοδραστικά συστατικά*

Τα βιοδραστικά συστατικά που συναντώνται στα ρεβίθια, σε πολλές περιπτώσεις αποτελούν τους βασικούς παράγοντες ώστε τα ρεβίθια να συγκεντρώνουν έναν αριθμό από ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, καθώς και οι λιγνάνες είναι παρόντα στα κυριότερα φυτοχημικά συστατικά των ρεβιθιών.

Τα ρεβίθια της ποικιλίας Desi υπερέχουν σε σχέση με αυτά του τύπου Kabuli, όσον αφορά την ποσότητα αντιοξειδωτικών συστατικών που εμπεριέχουν. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις και συνεπώς η πρόσληψη αυτών έχουν καθοριστική σημασία για την υγεία του οργανισμού. Ο οργανισμός σε βάθος χρόνου υφίσταται συνεχόμενες βλάβες από είδη δραστικού οξυγόνου (ROS), τα οποία είναι χαρακτηριστικά το υπεροξειδίο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι ρίζες υδροξυλίου και η διαμόρφωσή τους οφείλεται σε μια σειρά από ηλεκτρονιακές αναγωγές του μοριακού οξυγόνου. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά, λοιπόν, συνεισφέρουν τα μέγιστα στην αμυντική λειτουργία του οργανισμού απέναντι στην δράση των παραπάνω βλαβερών παραγόντων και στην προκειμένη περίπτωση προσλαμβάνονται απλά με την κατανάλωση ρεβιθιού ως τροφή από τον άνθρωπο.

Όπως και παραπάνω, γίνεται αναφορά στα φυτοχημικά συστατικά που εμπεριέχονται στο ρεβίθι. Τα φυτοχημικά, αυτά, συστατικά είναι φαινολικές ενώσεις και ειδικότερα ισοφλαβονοειδή και 5- δεοξυϊσοφλαβονοειδή, τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην αμυντική λειτουργία του οργανισμού με τον ενεργό ρόλο τους στην αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ επιπλέον είναι γνωστά για την συμμετοχή τους ως χημικοί σηματοδότες για την ρυθμίσεις σχετικές με το άζωτο στα κύτταρα. Οι κυριότερες ισοφλαβόνες που συναντώνται στο περιεχόμενο των σπόρων ρεβιθιού είναι η Α βιοχανίνη και η φορμονονετίνη. Τα περισσότερα εκ των φλαβονοειδών και των φαινολικών, τα οποία συναντώνται στους σπόρους των ρεβιθιών είναι ενσωματωμένα κατά κύριο λόγο στον φλοιό του σπόρου. Συγκριτικά, με κριτήριο τα παρακάτω χαρακτηριστικά, δηλαδή το φλαβονοειδές, το ολικό φαινολικό και την αντιοξειδωτική τους δράση, τα ρεβίθια ποικιλίας Desi είναι 11, 13 και 31 φορές επικρατέστερα αντίστοιχα ως προς κάθε ιδιότητα σε σχέση με τον κρεμώδη τύπο ρεβιθιών Kabuli. Επιπλέον, σχετικά με τα

υπόλοιπα εκ των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών, το χλωρογενικό οξύ, όπως και το Quercetin εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές συγκεντρώσεων .

Οι σπόροι ρεβιθίου παρουσιάζουν αφθονία όσον αφορά τις ποσότητες καροτενοειδών που περιέχουν και κυρίως ξανθοφύλλων, κρυπτοξανθίνης και Β καροτίνης. Από την δράση των καροτενοειδών φαίνεται να απορρέουν μερικά αρκετά σημαντικά οφέλη για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Διαδραματίζοντας καταλυτικό ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου συμβάλλουν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα. Τέλος, η κανθαξανθίνη είναι γνωστό ότι παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες. [15]

### 2.2.δ Μέθοδοι Επεξεργασίας

Τα ρεβίθια προτού καταναλωθούν ή περάσουν από περαιτέρω στάδια επεξεργασίας ώστε να αξιοποιηθούν για διάφορες εμπορικές χρήσεις, πολλές φορές υφίστανται αρχικά μια προεπεξεργασία. Η προεπεξεργασία, αυτή, μπορεί να γίνει με αξιοποίηση ενός αριθμού από τεχνικές και αποσκοπεί στην βελτίωση της γεύσης του τελικού προϊόντος, καθώς και της διατροφικής του αξίας. Ανάλογα την τεχνική επεξεργασίας στην οποία θα υποβληθεί η πρώτη ύλη, το τελικό προϊόν που προκύπτει έχει και διαφορετική μορφή. Οι τεχνικές, αυτές, χωρίζονται σε φυσικές, θερμικές ή βιοχημικές και έχουν σκοπό να διευκολύνουν την πέψη του τελικού προϊόντος και την βελτιστοποίηση της θρεπτικότητας του, απομακρύνοντας στοιχεία επιβλαβή ή χωρίς καμία θρεπτική αξία. Τα όσπρια, στην Ινδία όπου και αντιστοιχεί το 80% της ολικής κατανάλωσής τους, σερβίρονται κυρίως με τη μορφή «dhal» ή αλεύρου. Το «chana dhal» ονομάστηκε με τέτοιον τον τρόπο, ώστε να υποδηλώνεται η αποκόλληση και στη συνέχεια διαίρεση των δύο κοτυληδόνων. Επίσης, αναφορά της λέξης «dhal» γίνεται και στα χειρόγραφα της Σανσκριτικής, ενώ η σημασία, αυτής, αναφέρθηκε και από τους Charaka (Πατέρας της Ινδικής Ιατρικής) και Sushruta (Πατέρας της Ινδικής Χειρουργικής).

Το αλεύρι, το οποίο προκύπτει από την επεξεργασία ρεβιθίων είναι συνήθως γνωστό ως Besan και αποτελεί συστατικό για μερικές παραδοσιακές ινδικές συνταγές, όπως boondi, dhokla, rakoga, bhujia και διάφορα γλυκά κ.λπ., με τη μορφή ζύμης ή πάστας. Για την παρασκευή αλευριού ρεβιθίου, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο αποφλοιωμένοι σπόροι.

Οι τεχνικές επεξεργασίας με τις οποίες μπορούν τα ρεβίθια να αποκτήσουν εναλλακτικές μορφές, ώστε να αξιοποιηθούν καταναλωτικά μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- Τις φυσικές, στις οποίες περιλαμβάνονται η άλεση και το μούλιασμα
- Τις Βιοχημικές, όπως η βλάστηση των σπόρων και η ζύμωση
- Τις θερμικές, στις οποίες ανήκουν το ψήσιμο και η εξώθηση

[15]

### 2.2.ε Τάσεις στην αγορά

Όσον αφορά την αγορά γενικότερα, οι σπόροι ρεβιθίου εμφανίζονται με πολύ χαμηλές τιμές. Επομένως, όσο γίνονται προσπάθειες ώστε να απομονωθούν τα διάφορα συστατικά των ρεβιθίων, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη διατροφική αξία, ώστε να διατεθούν μεμονωμένα στην αγορά ή ως πρόσθετα σε άλλα προϊόντα, τόσο θα πληθαίνουν οι καλλιέργειες των σπόρων ρεβιθίου.

Μέχρι σήμερα, το ρεβίθι αξιοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων κυρίως για την προσθήκη φυτικών ινών σε ψωμί και ζυμαρικά, καθώς και για αλλαγή στην υφή χοιρινού κρέατος με χαμηλά λιπαρά. Έτσι, όλο και αυξανόμενες μελέτες πραγματοποιούνται και προσανατολίζονται προς την

πλήρη εκμετάλλευση του ρεβιθιού και των δυνατοτήτων που μπορεί να προσφέρει στον σχεδιασμό νέων προϊόντων. [15]



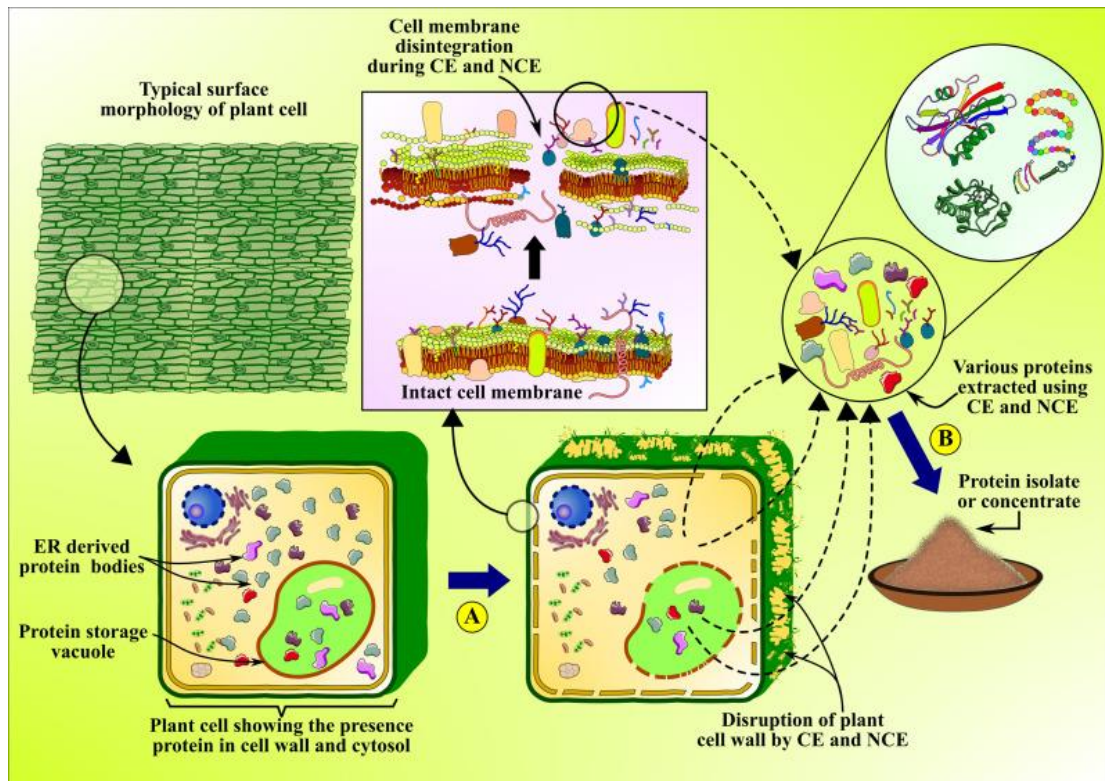
## Κεφάλαιο 3: Εκχύλισεις

### 3.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η αξιοποίηση των πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης καθίσταται δυνατή λόγω της ανάπτυξης τεχνικών εκχύλισης, οι οποίες εστιάζουν στις αντίστοιχες φυτικές μήτρες. Το 2018 διατυπώθηκαν από τους Rojić, Mišan και Tiwari διάφορες τεχνικές υγρής και ξηρής εκχύλισης όπως η εκχύλιση υποκρίσιμου νερού, η εκχύλιση αντίστροφων μικκυλίων και η εκχύλιση υδατικών συστημάτων δύο φάσεων. Αντίθετα δεν γινόταν ιδιαίτερη συζήτηση για άλλες σημαντικές τεχνικές εκχύλισης πρωτεϊνών όπως οι συμβατικές (π.χ. αλκαλικές), και οι μη συμβατικές (ενζυματικές, με χρήση μικροκυμάτων ή υπερήχων, υψηλής πίεσης, pulse field, με ομογενοποίηση). Συχνότερα, παρά την χαμηλή στις περισσότερες περιπτώσεις απόδοσή τους, χρησιμοποιούνται οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Η χαμηλότερη, αυτή απόδοση οφείλεται στην αποδόμηση των πρωτεϊνών, ενώ μπορεί να επηρεαστεί και από μια σειρά από παραμέτρους όπως ο χρόνος εκχύλισης, οι διαλύτες, το pH και η θερμοκρασία. Οι μη συμβατικές, παρά τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνουν όπως της ασφάλειας, της φιλικότητας προς το περιβάλλον, του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητας, δεν έχουν υιοθετηθεί σε μεγάλης κλίμακας εφαρμογές από την βιομηχανία.

Σήμερα, λοιπόν, η επιστημονική κοινότητα στρέφεται προς τις μη θερμικές πράσινες τεχνολογίες, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα εκχύλισης και η καταπολέμηση της αποδόμησης πρωτεϊνών κατά την εκχύλιση. Συνεπώς, οι μέθοδοι αυτές είναι φιλικές προς το περιβάλλον, εφόσον δεν απαιτούν την χρήση επικίνδυνων ή τοξικών χημικών ή διαλυτών. Τέλος, πληθώρα ερευνών επιδεικνύει, επίσης, ότι με ταυτόχρονη εφαρμογή συμβατικών και μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης πρωτεϊνών, είναι δυνατό να επιτευχθούν υψηλότερες αποδόσεις σε απομόνωση πρωτεΐνης και εκχυλισμάτων με βελτιωμένες λειτουργικές ιδιότητες.

Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζεται ο τρόπος που δρούν συμβατικές (conventional extractions) και μη συμβατικές τεχνικές (non conventional extractions) εκχύλισης πρωτεϊνών στο φυτικό κύτταρο.



Εικόνα 7: δράση συμβατικών (CE) και μη συμβατικών (NCE) εκχυλίσεων στο κύτταρο

Οι τεχνικές εκχύλισης πρωτεϊνών διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες. Αυτές είναι :

- Οι χημικές
- Οι ενζυμικές
- Οι φυσικές

[19], [20], [21]

### 3.2 Χημικές εκχυλίσεις

Η κατανομή των χημικών μεθόδων εκχύλισης γίνεται με βάση τον τύπο διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε περίπτωση. Τέτοιοι διαλύτες μπορούν να είναι νερό, αλκάλια, οργανικοί διαλύτες ή οξέα. Οι χημικές μέθοδοι, σε πολλές περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές με σκοπό την βελτιστοποίηση ανάκτησης πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια, προκαθορισμένες μέθοδοι και συνδυασμοί μεθόδων έχουν διαμορφωθεί για τον παραπάνω σκοπό. Επιπλέον, άλλος ένας καθοριστικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου απομόνωσης πρωτεϊνών είναι και η ίδια η φύση του δείγματος που θα εκχυλιστεί. Συνήθως, η επεξεργασία του φυτικού δείγματος περιλαμβάνει τρία στάδια. Τα στάδια, αυτά είναι κατά σειρά η απολίπανση του δείγματος, η εκχύλιση και τέλος η καταβύθιση της πρωτεΐνης. Οι χημικές μέθοδοι εκχύλισης χωρίζονται στις αλκαλικές και σε αυτές που χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες και εκπροσωπούν, ουσιαστικά, τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. [19]

#### 3.2.1 Αλκαλική εκχύλιση

Η αλκαλική εκχύλιση είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την απομόνωση φυτικών πρωτεϊνών ανάμεσα στις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Για την ρύθμιση του βασικού pH που απαιτείται, χρησιμοποιούνται NaOH και KOH. Συγκριτικά με την οργανική εκχύλιση οι αντίστοιχες αποδόσεις εκχύλισης είναι υψηλότερες. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών διασπώνται, λόγω του υψηλού pH και έτσι επιτυγχάνεται αυξημένη απόδοση στην απομόνωση

πρωτεϊνών . Το αυξημένο pH οδηγεί στον ιονισμό των όξινων και ουδέτερων αμινοξέων, κάτι που έχει ως συνέπεια την αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, η οποία συμβάλλει επιπλέον στην αυξημένη απόδοση ανάκτησης πρωτεΐνης. Επιπλέον, άλλη μία σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αλκαλική εκχύλιση είναι η θερμοκρασία. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας συμβάλλει στην σταθεροποίηση και την αναδίπλωση της πρωτεϊνικής δομής και ευνοεί την διατήρηση των ομοιοπολικών δεσμών που έχουν αναπτυχθεί εντός των πρωτεϊνών. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, δηλαδή σε επίπεδα των 140 °C, λαμβάνει χώρα, εξαιτίας της μεγάλης προσδιδόμενης ποσότητας θερμικής ενέργειας, η υδρόλυση της πρωτεΐνης σε ολιγοπεπτίδια λόγω. Παράλληλα, ένας αριθμός ερευνών εστιάζει στην επίδραση νέων παραμέτρων στην αύξηση της απόδοσης σε πρωτεΐνη της αλκαλικής εκχύλισης, με σκοπό την βελτιστοποίηση αυτής επιτυγχάνοντας το μικρότερο εφικτό κόστος. [19]

Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται με την τεχνική της αλκαλικής εκχύλισης ,από τις διάφορες φυτικές πρώτες ύλες, παρουσιάζουν βελτιωμένα επίπεδα βιοδιαθεσιμότητας, η πέψη τους από τον οργανισμό καθίσταται ευκολότερη. Από την άλλη, οι πρωτεΐνες που ανακτώνται με την μέθοδο αυτή έχουν υποστεί ως έναν βαθμό μετουσίωση, υδρόλυση και αφαίρεση κάποιων αμινοξέων με ταυτόχρονο σχηματισμό λυσινοαλανίνης. [19]

### 3.2.2 Αποτίμηση συμβατικών εκχυλίσεων

Επικεντρώνοντας στις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης πρωτεϊνών αναδύονται παράγοντες που τις καθιστούν όλο και λιγότερα υποσχόμενες. Τέτοιοι παράγοντες είναι η μεγάλη χρονική διάρκεια που απαιτείται για την διεξαγωγή τους, τα μεγάλα ποσά ενέργειας που απαιτούν και το γεγονός πως δεν είναι ιδιαίτερα φιλικές προς το περιβάλλον λόγω της χρήσης αλκαλικών ή οργανικών διαλυτών και οξέων. Ιδιαίτερα οι συμβατικές εκχυλίσεις που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες επιλέγονται όλο και λιγότερο λόγω της κατώτερης ποιότητας πρωτεϊνών που απομονώνονται. Από την πλευρά τους, οι αλκαλικές εκχυλίσεις αν και επιτυγχάνουν υψηλότερες αποδόσεις, επηρεάζουν την πρωτεϊνική πεπτικότητα, ενώ όσον αφορά αμινοξέα όπως είναι η λυσίνη και η κυστεΐνη, παρουσιάζονται βλάβες στην δομή τους, υποβαθμίζοντας ποιοτικά την προκύπτουσα πρωτεΐνη. Η λύση για την τελική απομόνωση πρωτεϊνών ικανοποιητικής ποιότητας με χρήση αλκαλικής εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί με την επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης αλκαλίων για κάθε περίπτωση φυτικής πρώτης ύλης.

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης παρουσιάζουν ευρύ πεδίο εφαρμογής. Σε αυτό το πεδίο ανήκουν διάφοροι σπόροι, δημητριακά, υπολείμματα γεωργίας και τα όσπρια. [19]

### 3.3 Εκχυλίσεις με υπερήχους (UAE, Ultrasound Assisted Extractions)

Κατά την διάρκεια των υποβοηθούμενων από υπερήχους εκχυλίσεων, επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη διάρρηξη των φυτικών κυττάρων για την απομόνωση των επιθυμητών συστατικών. Ο τρόπος δράσης των υπερηχητικών κυμάτων είναι η διαμόρφωση ακουστικών κοιλοτήτων, με σημεία που χαρακτηρίζονται από αυξημένη πίεση και θερμοκρασία να προκύπτουν. Τα σφαιρίδια αερίου που προκύπτουν από την δράση των υπερηχητικών κυμάτων, διαμόρφωση και καταρρέουν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα και με αυτόν τον τρόπο η μικροσκοπική ροή στην επιφάνεια των κυττάρων σε συνδυασμό με τα κύματα που την διαταράσσουν οδηγούν σε αυξημένες δυνάμεις μηχανικής και διατμητικής φύσης εκεί, οι οποίες καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα. Πλέον, ο διαλύτης δύναται να διαρρέει με χαρακτηριστική ευκολία το κύτταρο και να παρασύρει τις πρωτεΐνες που βρίσκονται εντός του. Μερικές παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των εκχυλίσεων με υπερήχους είναι η συχνότητα, η ισχύς, το χρονικό διάστημα εκχύλισης, η θερμοκρασία, το pH, ο λόγος πρώτης ύλης προς τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη και η ένταση υπερήχων. [17] [22]

Στις εκχυλίσεις με υπερήχους, τα αντίστοιχα υπερηχητικά κύματα μπορούν να εμφανίζουν από χαμηλή μέχρι υψηλή ένταση. Τα χαμηλής έντασης υπερηχητικά κύματα χρησιμοποιούνται σε μη καταστρεπτικές τεχνικές, ενώ τα υψηλής έντασης βρίσκουν εφαρμογή σε εκχυλίσεις, και για διαδικασίες γαλακτωματοποίησης ή διάχυσης. Τέλος, η εφαρμογή εκχυλίσεων με υπερήχους σε συνδυασμό με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες αποδόσεις σε πρωτεΐνη. [22]

Οι εκχυλίσεις με υπερήχους απαιτούν λιγότερο χρόνο και κόστος, είναι περισσότερο βολικές κατά την πραγματοποίησή τους και εμφανίζουν δυνατότητες ώστε να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα προς όφελος της βιομηχανίας τροφίμων και φυσικών προϊόντων. Επιπλέον, εφόσον δεν χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες κατά την πραγματοποίησή τους έχουν μειωθεί τα προβλήματα που σχετίζονται με την αποτυχία διατήρησης αυτών των θερμοκρασιών. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες που απομονώνονται χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο βαθμό μετουσίωσης και εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν θερμική αστάθεια απομονώνονται αποτελεσματικότερα με την βοήθεια υπερήχων. Από την άλλη, η απόδοση σε πρωτεΐνες μπορεί να μειωθεί υπό την επίδραση υπερήχων υψηλότερης ισχύος ή για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια. Είναι πιθανό η συσσωμάτωση πρωτεϊνών, η οποία είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ υπολειμμάτων κυστεΐνης, να ενεργοποιηθεί σε υπέρμετρο βαθμό από τα υπερηχητικά κύματα, μέσω των ελεύθερων ριζών υδροξυλίου που δημιουργούν. Τέλος, είναι δεδομένο πως οι παράμετροι των εκχυλίσεων με υπερήχους θα πρέπει να προσαρμόζονται σε κάθε περίπτωση στην φυτική πρώτη ύλη που θα χρησιμοποιηθεί. [22]

### 3.2 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων

Οι συμβατικές μέθοδοι SLE (Solid Liquid Extractions), οι οποίες χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα για την εκχύλιση βιοενεργών συστατικών, παρουσιάζουν κάποια ελαττώματα, τα οποία απορρέουν από παράγοντες, όπως οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, οι χαμηλές αποδόσεις ή οι υψηλές θερμοκρασίες. Επομένως, άνοιξε ο δρόμος για την εφαρμογή νέων εξελιγμένων τεχνικών εκχύλισης βιοενεργών συστατικών, όπως είναι η εκχύλιση με μικροκύματα (MAE).

Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα, αυτά αλληλεπιδρούν, έχοντας συχνότητες συνήθως 2,45 GHz με τον πολικό διαλύτη που έχει επιλεγεί σε επίπεδο μορίων, μέσω περιστροφής διπόλου και ιοντικής αγωγής. Κατά την επίδραση των μικροκυμάτων γίνεται διάρρηξη των κυττάρων και τα βιοδραστικά συστατικά, τα οποία πρόκειται να απομονωθούν, απομακρύνονται από το κυτταρικό τοίχωμα, διασπώντας τους δεσμούς υδρογόνου εκεί. Με την αλληλεπίδραση, αυτή, αυξάνεται και το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα να γίνεται ακόμα καλύτερη διείσδυση του διαλύτη. Η μετέπειτα μετατροπή των μικροκυμάτων σε θερμική ενέργεια στην φυτική μήτρα, οδηγεί στην εξάτμιση της υγρασίας λόγω της αυξημένης θερμότητας, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της πίεσης στο κυτταρικό τοίχωμα. Για την διεξαγωγή της εκχύλισης με μικροκύματα επιλέγεται ανοικτό ή κλειστό σύστημα, ανάλογα με τις επιλεγμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Το ανοικτό σύστημα επιλέγεται για τις περιπτώσεις όπου επιλέγονται συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ τα κλειστά συστήματα είναι ιδανικά για υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις.

Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης μπορούν να επιτευχθούν βελτιωμένες αποδόσεις, σε μικρότερους χρόνους και με χρήση μικρότερης ποσότητας διαλύτη. Τέλος, λόγω του χαμηλότερου κόστους και της απλής της λειτουργίας η τεχνική εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα προς όφελος της βιομηχανίας. [23]

## Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 4. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

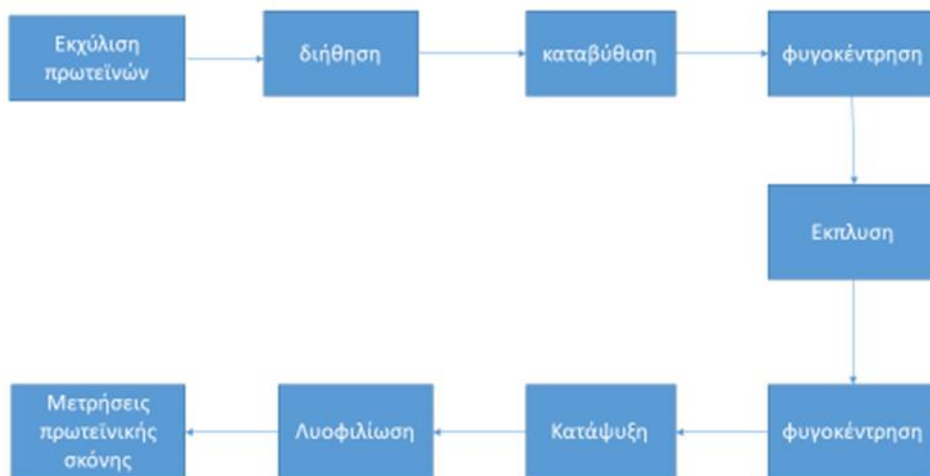
#### 4.1 Υλικά

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά ρεβίθια, αλλά και αλεύρι ρεβιθιού. Κατά τις διεργασίες απομόνωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αλεύρι ρεβιθιού της εταιρίας ΒΙΟΥΓΕΙΑ ΕΠΕ περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη 21.7 γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια αλευριού, ενώ για τις διεργασίες που αφορούν τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) χρησιμοποιήθηκαν ωμά, μη επεξεργασμένα ρεβίθια παραγωγής της εταιρίας Agrino.

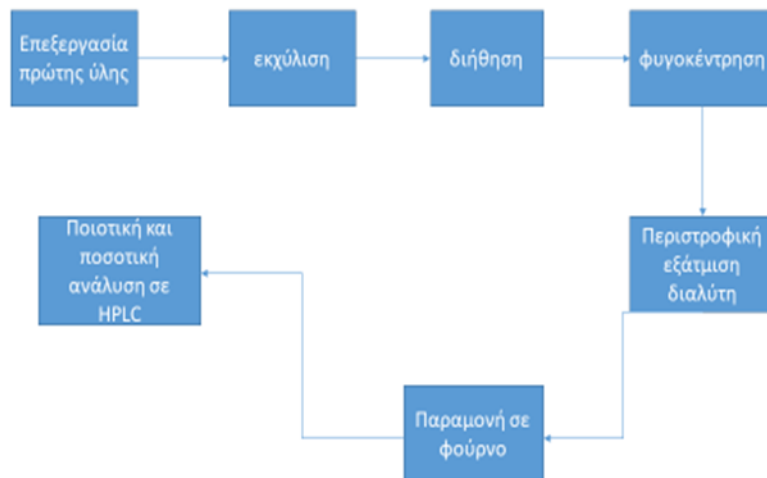
Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας των εταιρειών Sigma-Aldrich και Fischer.

#### 4.2 μέθοδοι

Στα παρακάτω διαγράμματα αναπαρίστανται οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται για την απομόνωση πρωτεϊνών και GOS αντίστοιχα.



Εικόνα 9: διάγραμμα ροής για τις διεργασίες απομόνωσης πρωτεϊνών



Εικόνα 10: διάγραμμα ροής για τις διεργασίες απομόνωσης γαλακτοολιγοσακχαριτών

#### 4.2.1 διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών

Λόγω της μικρής της ποσότητας σε λιπαρά, η πρώτη ύλη δεν χρειάζεται να περάσει από αρχικά στάδια επεξεργασίας, ώστε αυτά να απομακρυνθούν. Επομένως, το αγορασμένο αλεύρι ρεβιθιού θα περάσει απευθείας στο στάδιο της εκχύλισης, ώστε να προκύψει μετά από μια σειρά διεργασιών μια σκόνη πρωτεϊνικού περιεχομένου, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τις διάφορες μετρήσεις που θα πραγματοποιηθούν. [15]

##### 4.2.1.1 Εκχύλιση

Η εκχύλιση χρησιμοποιείται ως η μέθοδος διάρρηξης των φυτικών κυττάρων του ρεβιθιού, ώστε να απελευθερωθούν από το κυτταρικό τοίχωμα και να παρασυρθούν από τον επιλεγμένο διαλύτη οι πρωτεΐνες που πρόκειται να απομονωθούν. Σχετικά με το στάδιο της εκχύλισης, δοκιμάζονται δύο διαφορετικές τεχνικές και για κάθε μια από αυτές ελέγχεται η επίδραση των διαφορετικών τιμών παραμέτρων, οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν την διεργασία της εκχύλισης ως προς την συνολική πρωτεϊνική της απόδοση.

##### 4.2.1.1.α Αλκαλική εκχύλιση

Αρχικά, εφαρμόζεται ο περισσότερο διαδεδομένος τύπος εκχύλισης, ο οποίος ανήκει στις συμβατικές μεθόδους εκχυλίσεων και ονομάζεται αλκαλική εκχύλιση. Όπως υποδηλώνει το όνομά της, χρησιμοποιείται αλκαλικό διάλυμα για την ρύθμιση του βασικού pH του αρχικού διαλύτη. Κατά την πραγματοποίηση των συμβατικών αλκαλικών εκχυλίσεων δοκιμάζονται οι συνδυασμοί για τις παρακάτω διαφορετικές τιμές παραμέτρων. Αυτές οι παράμετροι είναι:

- Το χρονικό διάστημα εκχύλισης
- Η αναλογία πρώτης ύλης προς τον επιλεγμένο διαλύτη

#### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ζυγίζονται περίπου 2g αλευριού ρεβιθιού και παράγεται μια ποσότητα διαλύτη. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι απιονισμένο νερό με pH 9. Αυτό, επιτυγχάνεται με την

χρησιμοποίηση υδροξειδίου του νατρίου NaOH, για την παραγωγή ρυθμιστικού διαλύματος 1M NaOH. Για την παραγωγή του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος προστίθενται σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό περίπου τόσα γραμμάρια pellet NaOH, όσα και το μοριακό του βάρος, δηλαδή 40g. Η τιμή του pH του τελικού διαλύματος διαλύτη ελέγχεται με την βοήθεια εργαστηριακού pHμέτρου ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του, ενώ ταυτόχρονα υφίσταται ανάδευση, ώστε η μετρούμενη τιμή του pH να είναι αντιπροσωπευτική για ολόκληρο τον όγκο του διαλύματος. Όταν η τιμή σταθεροποιηθεί στο 9, τότε ο διαλύτης είναι έτοιμος για την εκχύλιση.

Ανάλογα με την επιλεγμένη αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη προστίθενται:

- 40 mL διαλύτη, για αναλογία 1:20
- 30 ml διαλύτη, για αναλογία 1:15

Η ζυγισμένη ποσότητα αλευριού ρεβιθιού μαζί με την αντίστοιχη, για κάθε αναλογία, ποσότητα διαλύτη, προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο τοποθετείται με την σειρά του σε μαγνητικό αναδευτήρα μαζί με έναν μαγνήτη ώστε να πραγματοποιείται η απαιτούμενη ανάδευση. Τέλος, ο συνολικός χρόνος ανάδευσης που συμπίπτει με το επιλεγμένο, σε κάθε περίπτωση, χρονικό διάστημα εκχύλισης είναι αντίστοιχα 15, 30 και 60 λεπτά. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για κάθε μία από τις δύο παραπάνω αναλογίες πραγματοποιούνται οι εκχυλίσεις σε κάθε ένα από τα παραπάνω χρονικά διαστήματα. Κάθε πείραμα εκτελείται από δύο φορές. [24]

#### 4.2.1.1.β εκχύλιση με υπερήχους

Η αλκαλική εκχύλιση δοκιμάζεται σε συνδυασμό με την τεχνική εκχύλισης με υπερήχους, ώστε να διαπιστωθούν τα οφέλη που μπορούν να προκύψουν από αυτήν την εφαρμογή, τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνικής απόδοσης, αλλά και σχετικά με ταυτόχρονη οικονομία χρόνου και ποσότητας χρησιμοποιημένου διαλύτη. Με την επίδραση των υπερήχων αναμένονται αναλογικά υψηλότερες αποδόσεις για τους χρόνους που θα διαρκέσουν οι εκχυλίσεις σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της απλής αλκαλικής, εφόσον γίνεται θεωρητικά αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων. Φυσικά, δοκιμάζονται και σε αυτήν την περίπτωση μερικές διαφορετικές τιμές παραμέτρων, ώστε να παρατηρηθεί κατά πόσον συσχετίζεται η συνολική πρωτεϊνική απόδοση από αυτές. Αυτές οι παράμετροι είναι:

- Η αναλογία πρώτης ύλης προς τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη
- Το χρονικό διάστημα εκχύλισης
- Η ισχύς των υπερήχων

#### **Πειραματική διαδικασία**

Αρχικά, όπως αντίστοιχα και για την απλή αλκαλική εκχύλιση πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης απιονισμένο νερό με pH 9. Το διάλυμα παράγεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με την συμβατική εκχύλιση. Έπειτα με βάση την αναλογία πρώτης ύλης προς την συνολική ποσότητα διαλύτη, ζυγίζονται, σε κάθε περίπτωση περίπου :

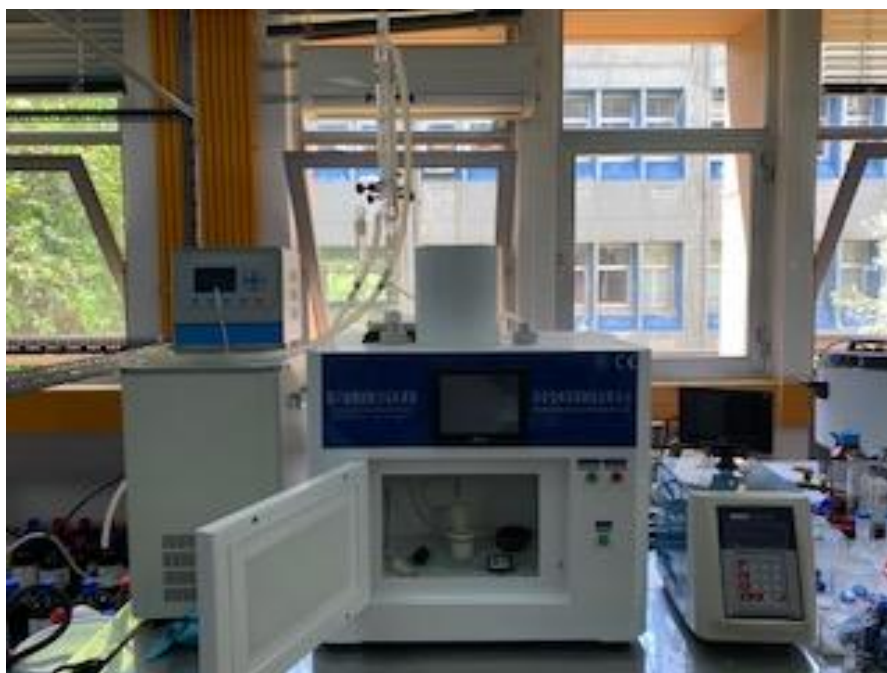
- 5,560 g για αναλογία 1:9
- 4,167 g για αναλογία 1:12
- 3,333 g για αναλογία 1:15

Για τις εκχυλίσεις με υπερήχους χρησιμοποιείται ο θάλαμος υπερήχων και μικροκυμάτων της εικόνας 11. Για κάθε εκχύλιση χρησιμοποιείται ένα δοχείο εκχύλισης (beaker), στο οποίο προστίθεται κάθε φορά σταθερή ποσότητα διαλύτη 50ml. Στην συνέχεια, προστίθεται στο beaker

η ζυγισμένη ποσότητα αλευριού ρεβιθιού, για την αντίστοιχη κάθε φορά, αναλογία. Το beaker ,που χρησιμοποιείται, είναι διπλού τοιχώματος, ώστε να πραγματοποιείται ο έλεγχος της θερμοκρασίας εκχύλισης με την ροή ψυκτικού στο εξωτερικό τοίχωμα, αφού υπό την επίδραση των υπερήχων αυτή αυξάνεται απότομα. Στο beaker προστίθεται, επίσης, μαγνήτης και ρυθμίζεται να πραγματοποιείται μαγνητική ανάδευση, ώστε όλο και μεγαλύτερη ποσότητα πρώτης ύλης να έρχεται σε επαφή με τα κύματα υπερήχων κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Η θερμοκρασία της εκχύλισης, ελέγχεται μέσω θερμομέτρου, ώστε να διατηρείται στους 25 °C και αυτό επιτυγχάνεται με την ρύθμιση της θερμοκρασίας του ψυκτικού που κυκλοφορεί. Το ψυκτικό που χρησιμοποιείται είναι η αιθυλενογλυκόλη. Ρυθμίζεται, επίσης, η ισχύς των υπερήχων. Η ισχύς στα πειράματα που ακολουθούνται λαμβάνει δύο διαφορετικές τιμές:

- 450 W, που αντιστοιχεί στο 50% της μέγιστης ισχύος
- 750 W, που αντιστοιχεί στο 83% της μέγιστης ισχύος

Δοκιμάζονται, τέλος, τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα εκχύλισης 5, 10 και 20 λεπτά. Τα πειράματα εκτελούνται για κάθε συνδυασμό τιμών των παραπάνω παραμέτρων και από δύο φορές το κάθε ένα. [25]



Εικόνα 11: διάταξη θαλάμου υπερήχων και μικροκυμάτων

#### 4.2.1.2 Διήθηση

Το επόμενο στάδιο μετά την εκχύλιση είναι η διήθηση του εκχυλίσματος. Η διήθηση στην συγκεκριμένη άσκηση πραγματοποιείται υπό κενό και στόχο έχει τον πλήρη διαχωρισμό του υγρού εκχυλίσματος από το σύνολο των στερεών σωματιδίων που παρέμειναν μετά το πέρας της εκχύλισης. Ο διαχωρισμός, αυτός επιτυγχάνεται μέσω του φίλτρου ή αλλιώς διηθητήρα, ο οποίος συγκρατεί τα στερεά σωματίδια, με την βοήθεια διηθητικού χαρτιού που τοποθετείται από πάνω του, μέσω των οπών που έχει στην επιφάνειά του. Η διήθηση διαρκεί έως ότου να σταματήσουν σταγόνες να διαπερνούν το φίλτρο. Τέλος, το συνολικό ίζημα απορρίπτεται, ενώ το διήθημα που συλλέγεται περνά στα επόμενα στάδια επεξεργασίας.





Εικόνα 12: πειραματική διαδικασία διήθησης

#### 4.2.1.3 Καταβύθιση

Πρίν από το στάδιο της καταβύθισης έγιναν δοκιμές ώστε να διαπιστωθεί αν το ένζυμο της λιποξυζενάσης επηρεάζει τις αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο της διεργασίας. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών γίνεται με την κλασσική μέθοδο του ισοηλεκτρικού σημείου. Επομένως, το pH του διηθήματος θα πρέπει να ρυθμιστεί σε τιμή, τέτοια ώστε τα μόρια των πρωτεϊνών να είναι ηλεκτρικά ουδέτερα. Αυτό το σημείο, ονομάζεται ισοηλεκτρικό και η τιμή του pH εκεί συμβολίζεται με pI. Στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν ελάχιστη διαλυτότητα με αποτέλεσμα να καταβυθίζονται. Σε αυτό το σημείο παρατηρείται για αυτόν τον λόγο μεγάλη θολότητα στο διάλυμα. [26]

#### Πειραματική διαδικασία

Ακολούθησε ολόκληρη η πειραματική διαδικασία με τα διηθήματα να υφίστανται θέρμανση 85 °C για μισή ώρα. Παρατηρήθηκε ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων δεν επηρεάζεται από την πραγματοποίηση ή όχι αυτού του βήματος και επομένως αγνοήθηκε στην συνέχεια.

Το διήθημα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως, μαζί με μαγνήτη επάνω σε αναδευτήρα και πραγματοποιείται μαγνητική ανάδευση. Το pH πρέπει να ρυθμιστεί, ώστε η τιμή του να φθάσει σε αυτήν του ισοηλεκτρικού σημείου, δηλαδή 4,5, όπως φαίνεται στην εικόνα 13. Η ρύθμιση του pH γίνεται με σταδιακή προσθήκη αραιού υδροχλωρικού οξέος HCl 0,1M. Μόλις επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή σταματά η προσθήκη υδροχλωρικού οξέος και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση, ώστε η καταβύθιση των πρωτεϊνών να γίνεται ομοιόμορφα σε όλον τον όγκο του. Η ανάδευση διαρκεί περίπου 10 λεπτά. [24], [25]



Εικόνα 13: πειραματική διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών

Στην συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται σε ψυγείο στην θερμοκρασία περίπου 4 °C, ώστε να παρατηρηθεί κρυστάλλωση των καταβυθισμένων πρωτεϊνών, όπως παρατηρείται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: ενδεικτικό της καταβύθισης πρωτεϊνών

#### 4.2.1.4 φυγοκέντρηση

Για την συλλογή της στερεής φάσης, στην οποία εμπεριέχονται οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες, από την υγρή φάση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στην διάταξη της εικόνας 15. Στην

συνέχεια, συλλέγεται το στερεό μέρος, ενώ το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται. Για την επίτευξη μεγαλύτερης καθαρότητας στο τελικό προϊόν, ακολουθούν σταδιακές εκπλύσεις και επιπλέον φυγοκεντρήσεις.

### Πειραματική διαδικασία

Μετά την καταβύθιση, οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες συλλέχθηκαν ύστερα από φυγοκέντρηση για 20 λεπτά με 3500 x g. Στην συνέχεια, παράγεται διάλυμα απιονισμένου νερού με pH 4.5, χρησιμοποιώντας αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0.1 M. Με το παραπάνω διάλυμα γίνεται η έκπλυση του στερεού που απομένει μετά το τέλος της φυγοκέντρησης. Η διαδικασία, αυτή, επαναλαμβάνεται για τρεις φορές με τις φυγοκεντρήσεις μετά από κάθε έκπλυση να πραγματοποιούνται για 15 λεπτά και στα 3500 x g, ενώ σε κάθε έκπλυση προστίθενται περίπου 25 ml του διαλύματος που φτιάχτηκε. [24], [25]



Εικόνα 15: Διάταξη φυγοκέντρησης

#### *4.2.1.5 Επαναδιάλυση*

Μετά το στάδιο της φυγοκέντρησης, οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στο στερεό επαναδιαλύονται σε απιονισμένο νερό με pH 7, έως ότου να παρατηρηθεί ομογενοποίηση ( περίπου 15 ml). Συνήθως, το pH του απιονισμένου νερού ήταν μικρότερο του 7, συνεπώς όταν χρειάστηκε έγινε ρύθμιση με διάλυμα NaOH 0.1 M.

Μετά την επαναδιάλυση, το πρωτεϊνικό διάλυμα αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -30 °C για τουλάχιστον δύο μέρες, ώστε να υποστεί λυοφιλίωση. [24], [25]

#### *4.2.1.6 λυοφιλίωση*

Το κατεψυγμένο πρωτεϊνικό διάλυμα θα πρέπει να έρθει σε μορφή σκόνης. Για τον λόγο αυτό υφίσταται λυοφιλίωση στην διάταξη της εικόνας 16. Για το στάδιο της λυοφιλίωσης χρησιμοποιείται το όργανο Freeze Drying Plant GT2 της Leybold – Heraeus, για την ξήρανση των δειγμάτων μέσω εξάχνωσης. Για τις συνθήκες χαμηλής πίεσης που απαιτούνται για την διαδικασία της λυοφιλίωσης, χρησιμοποιείται μία αντλία λαδιού (Edwards της Trivac).

### Πειραματική διαδικασία

Η προετοιμασία πριν την έναρξη της λυοφιλίωσης έχει ως εξής. Για αρχή, μία ώρα πριν την έναρξη της διαδικασίας, οι πλάκες, πάνω στις οποίες πρόκειται να τοποθετηθούν τα δείγματα, καταψύχονται και ταυτόχρονα ενεργοποιείται η μηχανή ψύξης του οργάνου μέσω της επιλογής "precooling". Στην συνέχεια, αφού έχει περάσει μία ώρα, οι πλάκες στερεώνονται στον θάλαμο ξήρανσης και αφού τα κατεψυγμένα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε αυτές, τοποθετείται και το κάλυμμα του θαλάμου. Με την επιλογή "drying" και ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση της αντλίας κενού ξεκινά η διαδικασία της λυοφιλίωσης. Τα δείγματα παραμένουν στο όργανο έως ότου να παρατηρηθεί πως έχουν αποκτήσει μορφή ξηρής σκόνης. Για τον υπολογισμό της απόδοσης της λυοφιλίωσης, αρχικά ζυγίζεται η τελική ποσότητα σκόνης που προκύπτει. Στην συνέχεια, η τιμή αυτή εκφράζεται ως ποσοστό επί της αρχικής ποσότητας ξηρού αλευριού που χρησιμοποιήθηκε. [24],[25]



Εικόνα 16: Διάταξη λυοφιλίωσης

#### *4.2.1.7 Μετρήσεις ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος*

Ο υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης σε πρωτεΐνες γίνεται με την εφαρμογή της μεθόδου Bradford. Η μέθοδος επιλέγεται λόγω της αποτελεσματικότητας που παρουσιάζει, ενώ επίσης είναι ενδεδειγμένη για την μέτρηση της ποσότητας των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, το οποίο είναι και το είδος πρωτεϊνών που απομονώνονται.

Για την εκτέλεση της μεθόδου Bradford χρησιμοποιείται το διάλυμα του BrilliantBlueG . Με την προσθήκη του παραπάνω διαλύματος επιτυγχάνεται η διαμόρφωση ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών, το οποίο δίνει την μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Το όργανο, το οποίο χρησιμοποιείται, είναι το φασματοφωτόμετρο UV. Η τιμή της απορρόφησης, η οποία λαμβάνεται σαν ένδειξη, είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης του εκχυλίσματος. Η

μέθοδος Bradford εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στην πρωτεΐνη αλβουμίνη και επομένως αυτή είναι η πρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης των μετρήσεων στο φασματοφωτόμετρο UV (εικόνα 17). [24]



Εικόνα 17: Διάταξη φασματοφωτόμετρου UV

### **Πειραματική διαδικασία**

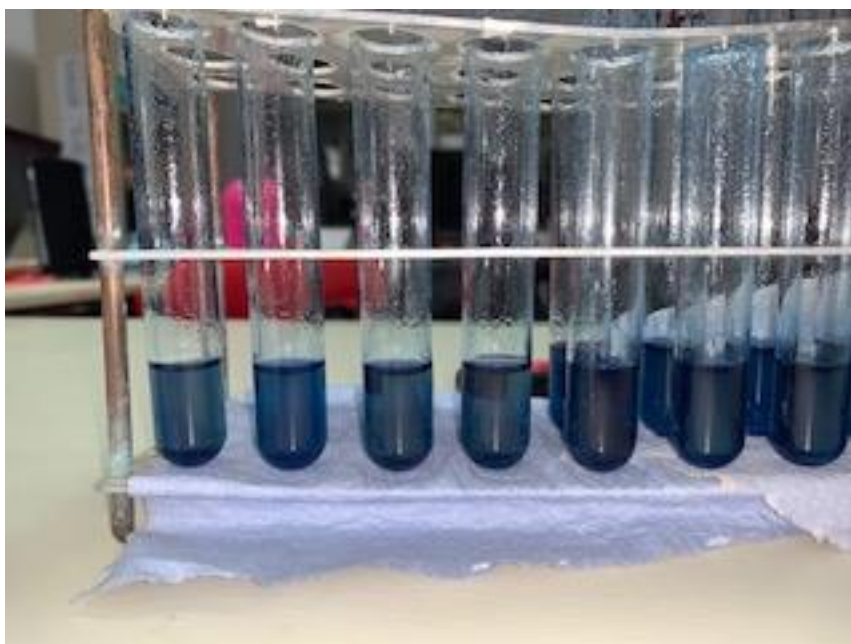
Αρχικά, γίνεται προετοιμασία του διαλύματος BrilliantBlueG. Πρώτα ζυγίζονται 10 mg του BrilliantBlueG, τα οποία διαλύονται σε 5 ml αιθανόλης. Έπειτα, προστίθενται 10 ml φωσφορικού οξέως 85% και γίνεται ήπια ανάδευση για την ομογενοποίηση του διαλύματος. Στην συνέχεια, γίνεται αραίωση του διαλύματος με απιονισμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 100ml. Τέλος, το διάλυμα θα περάσει μέσα από διηθητικό χαρτί, όπως παρατηρείται στην παρακάτω εικόνα. Το διάλυμα εμφιαλώνεται, ενώ η φιάλη που χρησιμοποιείται περιτυλίσσεται, ώστε να μην υπάρχει επίδραση του φωτός στο διάλυμα.

Έχοντας διαθέσιμο, πλέον, το διάλυμα BrilliantBlueG, διαμορφώνεται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης- συγκέντρωσης στο φασματοφωτόμετρο UV. Για τον σκοπό αυτό, όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιούνται γνωστές συγκεντρώσεις (0-1.5 mg/ml) της πρωτεΐνης αλβουμίνης σε νερό και σημειώνονται οι αντίστοιχες απορροφήσεις, από τις οποίες αφαιρείται η τιμή της απορρόφησης του σκέτου νερού.



Εικόνα 18: Διαδικασία παρασκευής διαλύματος Bradford

Για κάθε δείγμα ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος περίπου 50 mg σκόνης. Έπειτα, παρασκευάζεται ως διαλύτης απιονισμένο νερό με pH 9.5. Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη από σταγόνες διαλύματος NaOH 0.1 M. Η ζυγισμένη ποσότητα μαζί με 10 ml διαλύτη προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα υφίσταται μαγνητική ανάδευση για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, το διάλυμα υφίσταται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 3500 x g , έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα στο νερό συστατικά. Από το υπερκείμενο υγρό, λαμβάνονται με ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας των 0-100  $\mu$ l 0,1ml και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 3 ml διαλύματος Bradford με ηλεκτρονική πιπέτα ακριβείας των 0-5000  $\mu$ l. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιούνται 0,1ml διαλύτη μαζί με 3 ml διαλύματος Bradford. Το διάλυμα ανακινείται στην συσκευή Vortex και αποκτά ένα χαρακτηριστικό μπλέ χρώμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 19, λόγω της χρωστικής ουσίας που εμπεριέχεται στο διάλυμα Bradford, ενώ στο τυφλό δείγμα δεν παρατηρείται αλλαγή του χρώματος. Μετά από 15 λεπτά κάθε διάλυμα μεταφέρεται σε μια κυβέτα και μετρείται η απορρόφησή του στο φασματοφωτόμετρο UV. Η τιμή της απορρόφησης που παρουσιάζεται ως ένδειξη στην οθόνη του UV αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεϊνικού περιεχομένου για το αντίστοιχο διάλυμα πρωτεϊνικής σκόνης.



Εικόνα 19: Αλλαγή χρώματος από την προσθήκη διαλύματος πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε διάλυμα Bradford

#### 4.2.1.8 φυσικοχημικές αναλύσεις πρωτεϊνών

Επιπλέον, γίνεται μια σειρά αναλύσεων στα ξηρά εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις. Ο στόχος των παρακάτω αναλύσεων είναι ο ποιοτικός χαρακτηρισμός της πρωτεϊνικής σκόνης που παράγεται με βάση κάποια συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η ανάδειξη της επίδρασης της τεχνολογίας των υπερήχων στα χαρακτηριστικά αυτά μέσα από τις σχετικές συγκρίσεις των εκχυλισμάτων που προκύπτουν με την χρήση της συμβατικής αλκαλικής εκχύλισης και των αντίστοιχων που έχουν προκύψει με εκχύλιση υποβοηθούμενης από υπερήχους.

##### 4.2.1.8.α Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Particle Size Distribution)

Αρχικά μελετάται η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων σε δείγματα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Η διαδικασία πραγματοποιείται, αφενός, για να παρατηρηθεί η πραγματική κατανομή των διαμέτρων των σωματιδίων των εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης, καθώς και εκχύλισης με υπερήχους και αφετέρου για να πραγματοποιηθεί σύγκριση των κατανομών μεταξύ των δύο τύπων εκχυλισμάτων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να εκτιμηθεί η επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων στην διακύμανση της διαμέτρου των σωματιδίων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Για την ανάλυση της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων χρησιμοποιείται το όργανο Laser diffraction particle size analyzer (Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer) της εικόνας 20, για επίπεδα μικρομέτρων μm. Για αρχή επιλέγεται για την διασπορά της σκόνης υγρό το οποίο δεν μπορεί να διαλύσει την σκόνη, ώστε να μπορεί να γίνει η ανάλυση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως μέσο διασποράς χρησιμοποιείται μεθανόλη. Μικρή ποσότητα σκόνης κάθε εκχυλίσματος, αντίστοιχα, τοποθετείται σταδιακά στον κατάλληλο υποδοχέα του οργάνου, έως ότου να βγει η ικανοποιητική ένδειξη στην οθόνη του συνδεδεμένου ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να πραγματοποιηθεί η έναρξη της ανάλυσης. Στο τέλος της ανάλυσης, όλες οι

σχετικές πληροφορίες, καθώς και τα διαγράμματα των κατανομών εμφανίζονται στην οθόνη του συνδεδεμένου ηλεκτρονικού υπολογιστή.



Εικόνα 20: Διάταξη Laser diffraction particle size analyzer

#### 4.2.1.8.β (Water and oil holding capacity)

Ο δεύτερος έλεγχος σχετικά με τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων που πραγματοποιήθηκε, αφορά τις δυνατότητες κατακράτησης νερού και ελαίου από τα εκχυλίσματα. Και σε αυτήν την περίπτωση, η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί για εκχύλισμα που προέκυψε από συμβατική αλκαλική εκχύλιση, καθώς και για εκχύλισμα που είναι αποτέλεσμα εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους, ώστε να διαπιστωθούν πιθανά οφέλη της επίδρασης των υπερήχων σε αυτά τα φυσικά χαρακτηριστικά.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Οι δυνατότητες κατακράτησης νερού και ελαίου, αντίστοιχα, μελετήθηκαν με την χρήση μιας μεθόδου που περιγράφει ο Beuchat (1977). Αρχικά, σε δοχεία falcon των 10 ml, τοποθετούνται, σε κάθε περίπτωση 100 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και προστίθενται, αντίστοιχα για κάθε μέτρηση 3ml απιονισμένου νερού ή ηλιελαίου. Στην συνέχεια, κάθε δοχείο ανακινείται έντονα με χρήση της συσκευής Vortex και τοποθετείται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στην θερμοκρασία των 30 °C. Τέλος, τα δείγματα υφίστανται φυγοκέντρωση για 20 λεπτά σε 3500 x g, με το υπερκείμενο να απομακρύνεται και να συλλέγεται προσεκτικά ώστε να ζυγιστεί. Η διαφορά της μάζας της αρχικής ποσότητας νερού ή ηλιελαίου με αυτήν του υπερκειμένου που συλλέγεται κάθε φορά, αντιστοιχεί στην ποσότητα ελαίου ή νερού που δεσμεύει το εκχύλισμα . [25], [27]

#### 4.2.1.8.γ διαλυτότητα πρωτεϊνών

Ο τρίτος έλεγχος που πραγματοποιείται εστιάζει στις δυνατότητες διάλυσης των απομονωμένων πρωτεϊνών, των δύο τύπων εκχυλισμάτων, σε ένα εύρος τιμών pH. Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται έχουν ως στόχο να αναδείξουν τον βαθμό που επηρεάζει το pH στην διαλυτότητα των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων, καθώς και την σύγκριση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών των δύο τύπων εκχυλισμάτων σε κάθε μία επιμέρους και συνολικά για όλες τις τιμές pH.



## Πειραματική διαδικασία

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων αναλύεται με την μέθοδο των Bera and Mukherjee (1989) με μικρές παραλλαγές. Για τα εκχυλίσματα συμβατικής αλκαλικής εκχύλισης και εκχύλισης με υπερήχους ετοιμάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/ml σε τιμές pH 2,4,6,8, 9.5. Το pH ρυθμίζεται με διαλύματα HCl και NaOH 1M. Τα διαλύματα υφίστανται μαγνητική ανάδευση για μία ώρα και ακολουθεί η φυγοκέντρωσή τους για 10 λεπτά σε 3500 x g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό, εφόσον τα αδιάλυτα συστατικά παραμένουν στον πυθμένα. Η συγκέντρωση της περιεχόμενης πρωτεΐνης για κάθε δείγμα εκχυλίσματος μετριέται με την μέθοδο Bradford, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, όπως και στις μετρήσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων. [25]

### 4.2.2 διαδικασία απομόνωσης γαλακτοολιγοσακχαριτών

#### 4.2.2.1 επεξεργασία πρώτης ύλης

Τα ωμά ρεβίθια τοποθετούνται αρχικά σε σκληρή επιφάνεια και στην συνέχεια με την βοήθεια σφυριού χτυπώνται με σκοπό την μείωση του μεγέθους τους, ώστε να περάσουν στο επόμενο στάδιο επεξεργασίας. Το επόμενο στάδιο είναι η άλεσή τους με το κατάλληλο mixer. Τα αλεσμένα ρεβίθια περνούν στο επόμενο στάδιο επεξεργασίας, το οποίο είναι η κοσκίνηση. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιείται φίλτρο 100 micron. Έτσι, προκύπτει η τελική μορφή της πρώτης ύλης, όπως φαίνεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Τελική μορφή πρώτης ύλης

#### 4.2.2.2 εκχύλιση

Το αλεύρι ρεβιθιού περνά αμέσως μετά στο στάδιο της εκχύλισης. Για να απομονωθούν οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες από το εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, θα πρέπει πρώτα να γίνει η διάρρηξή τους. Στην εργασία, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης. Η πρώτη είναι η συμβατική μέθοδος εκχύλισης στερεού υγρού (SLE, Solid Liquid Extraction). Γίνονται δοκιμές εναλλακτικών συνδυασμών από διαφορετικές τιμές παραμέτρων και διαφορετικών

διαλυτών, ώστε να βελτιστοποιηθεί η διεργασία εκχύλισης των GOS. Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η εκχύλιση SLE με την βοήθεια μικροκυμάτων (MAE, Microwave Assisted Extraction). Η MAE δοκιμάζεται, ώστε να διαπιστωθεί εάν η επίδραση των μικροκυμάτων συνεισφέρει στην αποτελεσματικότερη εκχύλιση των γαλακτοολιγοσακχαριτών σε μικρότερους χρόνους και για μικρότερες ποσότητες διαλύτη.

#### 4.2.2.2.α εκχύλιση στερεού-υγρού

Για την συμβατική μέθοδο εκχύλισης SLE δοκιμάζεται η επιρροή τριών διαφορετικών παραμέτρων:

- Του τύπου διαλύτη
- Της χρονικής διάρκειας εκχύλισης
- Της θερμοκρασίας

#### **Πειραματική διαδικασία**

Για την συμβατική εκχύλιση στερεού-υγρού επιλέγεται αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:20 για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Ζυγίζονται, αρχικά, 10 g αλεσμένου ρεβιθιού. Στην συνέχεια συγκεντρώνονται σε ογκομετρικό κύλινδρο 200 ml διαλύτη. Δοκιμάζονται τέσσερις διαφορετικοί τύποι διαλύτη. Αυτοί είναι:

- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη
- Μίγμα αιθανόλης- νερού με αναλογία 60-40 σε ποσοστιαία βάση
- Μίγμα αιθανόλης-νερού με αναλογία 75-25 σε ποσοστιαία βάση

Το μίγμα διαλύτη στερεού βρίσκεται σε ποτήρι ζέσεως και υφίσταται μαγνητική ανάδευση για τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα: 15, 30 και 60 λεπτά. Οι εκχυλίσεις γίνονται σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες και συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν η θερμοκρασία δωματίου περίπου (25 °C) και 50 °C. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για όλους τους διαφορετικούς συνδυασμούς διαλύτη, χρονικού διαστήματος και θερμοκρασίας. [28]

#### 4.2.2.2.α εκχύλιση στερεού υγρού με την βοήθεια μικροκυμάτων ( MAE)

Όπως αναφέρθηκε χαρακτηριστικά, τα μικροκύματα συμβάλουν καθοριστικά στην αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη εξαγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών, όπως και κάθε άλλου βιοδραστικού συστατικού από το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων. Επομένως, για τον λόγο αυτό, δοκιμάζεται αν είναι δυνατό μέσω της τεχνικής, αυτής, να προκύψουν καλύτερες αποδόσεις όσον αφορά την απομόνωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Επίσης, γίνεται σύγκριση, σε ποιοτικό και ποσοτικό επίπεδο, του περιεχομένου των εκχυλισμάτων, τα οποία θα προκύψουν μέσω αυτής της τεχνικής, με αντίστοιχα που προέκυψαν από την απλή συμβατική μέθοδο SLE αναλογικά για τις συνθήκες που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Για την εκχύλιση με μικροκύματα χρησιμοποιείται ο θάλαμος υπερήχων και μικροκυμάτων . Για κάθε εκχύλιση χρησιμοποιείται ένα δοχείο εκχύλισης (beaker), στο οποίο προστίθεται κάθε φορά σταθερή ποσότητα διαλύτη 40ml. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το μίγμα αιθανόλης-νερού με αναλογία 60-40 % σε ποσοστιαία βάση. Επιλέγεται σταθερή αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:20 και για κάθε εκχύλιση ζυγίζεται ποσότητα αλεσμένου ρεβιθιού περίπου 2g. Η ζυγισμένη ποσότητα αλευριού ρεβιθιού μαζί με τον διαλύτη έχουν τοποθετηθεί στο beaker μαζί με μαγνήτη για να πραγματοποιείται ταυτόχρονα μαγνητική ανάδευση, ώστε όλο και μεγαλύτερο

ποσοστό της βιομάζας να έρχεται σε επαφή με την μικροκυματική ακτινοβολία για ακόμα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Η χρονική διάρκεια της εκχύλισης για κάθε πείραμα θα είναι 5, 10 ή 20 λεπτά με την θερμοκρασία να ρυθμίζεται στους 50 °C. Η ισχύς των μικροκυμάτων επιλέγεται στα 250 W. [28]

#### 4.2.2.3 Διήθηση

Όπως και αντίστοιχα στην περίπτωση των πρωτεϊνών, μετά το στάδιο της εκχύλισης ακολουθεί διήθηση υπό κενό για τον διαχωρισμό του υγρού εκχυλίσματος από το στερεό που απομένει από την εκχύλιση, το οποίο απορρίπτεται και συλλέγεται μόνο το υγρό εκχύλισμα.

#### 4.2.2.4 Φυγοκέντρηση

Τα υγρά διηθήματα περνούν στο στάδιο της φυγοκέντρησης. Κάθε φυγοκέντρηση πραγματοποιείται για 3500 x g για 20 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, αποθηκεύεται μόνο το υπερκείμενο υγρό, στο οποίο είναι διαλυμένοι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες και το στερεό που απομένει κάθε φορά απορρίπτεται.

Το υπερκείμενο υγρό, στην συνέχεια, αποθηκεύεται στην κατάψυξη των -30 °C, μέχρι να υποστεί περαιτέρω ανάλυση. [28]

#### 4.2.2.5 απομόνωση ξηρού εκχυλίσματος

Ανάλογα με τον διαλύτη που έχει χρησιμοποιηθεί σε κάθε εκχύλιση, επιλέγεται αντίστοιχα και ο τρόπος με τον οποίο θα απομονωθεί και θα υπολογιστεί η ποσότητα του συνολικού ξηρού εκχυλίσματος, το οποίο θα είναι πλούσιο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Όσον αφορά, λοιπόν, τα υδατικά εκχυλίσματα επιλέγεται η μέθοδος της λυοφιλίωσης. Από την άλλη, για τα εκχυλίσματα, τα οποία είναι είτε πλήρως αιθανολικά ή ο διαλύτης τους είναι μίγμα αιθανόλης νερού με αναλογίες 75:25 ή 60:40, χρησιμοποιείται η μέθοδος της περιστροφικής εξάτμισης.

#### 4.2.2.5.α λυοφιλίωση

Από τις συνολικές ποσότητες υγρών υδατικών εκχυλισμάτων συλλέγονται, για κάθε εκχύλιση αντίστοιχα, γνωστοί όγκοι εκχυλίσματος και τοποθετούνται στην κατάψυξη σε προζυγισμένα δοχεία falcons. Στην συνέχεια υφίστανται λυοφιλίωση έως ότου να απομακρυνθεί ολόκληρη η ποσότητα υγρασίας. Όταν σε κάθε δοχείο απομείνει αποκλειστικά το ξηρό εκχύλισμα, γίνεται ζύγιση του δοχείου και διαπιστώνεται η ακριβής ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί στον γνωστό όγκο υγρού εκχυλίσματος. Έχοντας διαθέσιμα τα παραπάνω δεδομένα, μπορεί να υπολογιστεί η συνολική ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος που προκύπτει από κάθε εκχύλιση με υδατικό διαλύτη και οι αντίστοιχες αποδόσεις.

#### 4.2.2.5.β Περιστροφική Εξάτμιση

Η απομόνωση του ξηρού εκχυλίσματος για τα εκχυλίσματα που εμπεριέχουν διαλύτη αποκλειστικά αιθανόλη ή μίγμα αιθανόλης με νερό γίνεται ύστερα από την διαδικασία της περιστροφικής εξάτμισης. Κατά την διεργασία της περιστροφικής εξάτμισης, χρησιμοποιείται μια ποσότητα υγρού εκχυλίσματος αντίστοιχα για κάθε εκχύλιση, ώστε στο τέλος να απομονωθεί, με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα, το ξηρό εκχύλισμα μετά την απομάκρυνση του διαλύτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί, σε κάθε περίπτωση, η συνολική ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος και η απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα για κάθε εκχύλιση.

### **Πειραματική διαδικασία**

Για την διεργασία της περιστροφικής εξάτμισης τοποθετείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη μια ποσότητα γνωστού όγκου υγρού εκχυλίσματος, με την σφαιρική φιάλη, στην συνέχεια, να

συνδέεται με τον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου να απομακρυνθεί εμφανώς όλη η ποσότητα διαλύτη και να απομένει το ξηρό εκχύλισμα. Για την επίτευξη της πλήρους απομάκρυνσης του διαλύτη, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στον φούρνο σε θερμοκρασία 40 °C για περίπου 10ώρες. Τέλος, γίνεται εκ νέου ζύγιση της σφαιρικής φιάλης και υπολογίζεται το περιεχόμενό της σε ξηρό εκχύλισμα με βάση το αποτέλεσμα της ζύγισης της κενής σφαιρικής φιάλης.



Εικόνα 22: Διάταξη περιστροφικής εξάτμισης

#### *4.2.2.6 ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων*

Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των γαλακτοολιγοσακχαριτών από το συνολικό υγρό εκχύλισμα γίνεται με την χρησιμοποίηση της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Τα ξηρά εκχυλίσματα που έχουν προκύψει διαλύονται σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- νερό με αναλογία 75:25. Προστίθεται τόση ποσότητα διαλύτη, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης ομογενοποίηση του διαλύματος, με τα ταυτόχρονη μαγνητική ανάδευση σε συνθήκες ήπιας θέρμανσης. Μια ποσότητα του διαλύματος, για κάθε δείγμα συλλέγεται με μία σύριγγα και στην συνέχεια μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια, αφού πρώτα υποστεί φιλτράρισμα με φίλτρο μεμβράνης 0.45 μm millipore.

Ακολουθεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία πραγματοποιείται στο σύστημα HPLC LC-20AD της εταιρίας SHIMADZU και ανιχνευτή RID-10A. Οι διαχωρισμοί των σακχάρων των εκχυλισμάτων, αλλά και των πρότυπων σακχάρων γίνονται στην στήλη Sugar-D column (4.6 x

250 mm), Η κινητή φάση που συναντάται είναι, όπως αναφέρθηκε, ακετονιρίλιο-νερό (βαθμού καθαρότητας HPLC) 75:25, v/v, με ρυθμό ροής 1.0 ml/min. Ο όγκος της κάθε ένεσης είναι 20 μl.

Στα χρωματογραφήματα που προκύπτουν, γίνεται σύγκριση των χρόνων έκλουσης, των κορυφών και των εμβαδών τους για τις περιπτώσεις των εκχυλισμάτων μεταξύ τους και με τα αντίστοιχα στοιχεία για τα πρότυπα σάκχαρα (σουκρόζη, σταχυόζη και ραφφινόζη). Με αυτόν τον τρόπο θα εξαχθούν τα κατάλληλα συμπεράσματα ποιοτικού και ποσοτικού χαρακτήρα για το περιεχόμενο όλων των περιπτώσεων εκχυλισμάτων σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. [29]

## Κεφάλαιο 5: επεξεργασία αποτελεσμάτων

### 5.1 μετρήσεις πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

#### 5.1.1 μετρήσεις ξηρού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Αρχικά, παρουσιάζονται στον πίνακα 2 τα αποτελέσματα και οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα ή αλλιώς αποδόσεις εκχύλισης, για τις συμβατικές αλκαλικές εκχυλίσεις, αφού έχει απομακρυνθεί η περιεχόμενη υγρασία με την διαδικασία της λυοφιλίωσης.

Πίνακας 2: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των συμβατικών εκχυλίσεων

Εκχύλιση	Αναλογία στερεού προς διαλύτη	Χρόνος (λεπτά)	Απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
1α	1:15	15	10.69
2α	1:15	30	16.14
3α	1:15	60	13.22
1β	1:15	15	10.34
2β	1:15	30	16.87
3β	1:15	60	13.42
4α	1:20	15	14.18
5α	1:20	30	15.13
6α	1:20	60	15.15
4β	1:20	15	9.02
5β	1:20	30	14.90
6β	1:20	60	13.23

Παρατηρείται πως για χρόνους εκχύλισης 30 λεπτών παρουσιάζονται οι καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης. Στον πίνακα 3 εμφανίζονται οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από υπερήχους για αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 9.

Πίνακας 3: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων με βοήθεια υπερήχων αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:9

Εκχύλιση	Αναλογία στερεού προς διαλύτη	Χρόνος (λεπτά)	Απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
1A1α	5	450	16.11
1A2α	5	750	16.58
1A1β	5	450	15.44
1A2β	5	750	16.84
1B1α	10	450	17.53
1B2α	10	750	21.48
1B1β	10	450	17.07
1B2β	10	750	21.32

1Γ1α	20	450	18.83
1Γ2α	20	750	19.07
1Γ1β	20	450	19.03
1Γ2β	20	750	19.17

Παρατηρείται πως για την αναλογία 1 προς 9 σε χρόνους 10 και 20 λεπτών οι αποδόσεις είναι μεγαλύτερες. Η αύξηση της ισχύος επηρεάζει αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης και εντονότερα σε χρόνους 10 λεπτών. Ωστόσο, όπως θα διαπιστωθεί παρακάτω δεν έχει θετική επίδραση στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος.

Στον πίνακα 4 εμφανίζονται οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από υπερήχους για αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 12.

Πίνακας 4: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων με βοήθεια υπερήχων αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:12

Εκχύλιση	Χρόνος (min)	Ισχύς (Watt)	Απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
2A1α	5	450	17.05
2A2α	5	750	18.46
2A1β	5	450	17.03
2A2β	5	750	17.90
2B1α	10	450	17.50
2B2α	10	750	18.56
2B1β	10	450	17.43
2B2β	10	750	19.95
2Γ1α	20	450	16.33
2Γ2α	20	750	17.99
2Γ1β	20	450	16.12
2Γ2β	20	750	17.42

Παρατηρείται πως για την αναλογία 1 προς 12 σε χρόνους 10 λεπτών εμφανίζονται ελαφρώς καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης. Η αύξηση της ισχύος επηρεάζει θετικά την απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, όπως θα διαπιστωθεί παρακάτω δεν έχει θετική επίδραση στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος.

Στον πίνακα 5 εμφανίζονται οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από υπερήχους για αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15.

Πίνακας 5: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων με βοήθεια υπερήχων αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:15

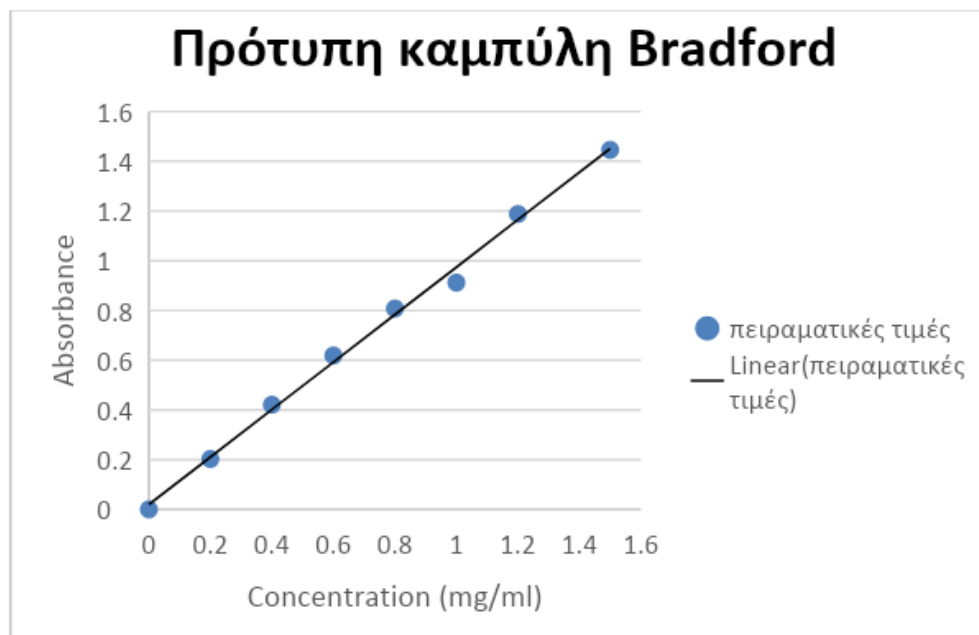
Εκχύλιση	Χρόνος (min)	Ισχύς (Watt)	Απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
3A1α	5	450	15.66
3A2α	5	750	15.24

3A1β	5	450	16.20
3A2β	5	750	16.86
3B1α	10	450	16.97
3B2α	10	750	16.95
3B1β	10	450	16.95
3B2β	10	750	17.91
3Γ1α	20	450	17.91
3Γ2α	20	750	18.07
3Γ1β	20	450	17.85
3Γ2β	20	750	18.63

Παρατηρείται πως για την αναλογία 1 προς 15 σε χρόνους 20 λεπτών εμφανίζονται ελαφρώς καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης, χωρίς ωστόσο να υπάρχει αύξηση σε πρωτεϊνική περιεκτικότητα του εκχυλίσματος με την αύξηση του χρόνου, ενώ αντίθετα αυτό μειώνεται, όπως θα αναδειχθεί παρακάτω. Η αύξηση της ισχύος επηρεάζει θετικά την απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, όπως θα διαπιστωθεί παρακάτω δεν έχει θετική επίδραση στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος.

#### 5.1.2 πρότυπη καμπύλη Bradford

Πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, σχεδιάζεται πρώτα η πρότυπη καμπύλη με την χρήση καθαρής αλβουμίνης. Παρασκευάζονται διαλύματα αλβουμίνης συγκέντρωσης 0-1,5 mg/ml με απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη για κάθε εκχύλισμα, σε συνάρτηση με τις τιμές απορρόφησης, υπολογίζεται σύμφωνα με την καμπύλη του διαγράμματος, με εξίσωση  $y = 0.9545 \cdot x + 0.0195$  και  $R = 0.9961$ .



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα πρότυπης καμπύλης Bradford



### 5.1.3 μετρήσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου

Μετά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, μπορεί να φωτομετρηθεί το σύνολο των δειγμάτων, ώστε να φανεί η επίδραση των υπερήχων στην πρωτεϊνική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων, όπως και η αξιολόγηση των τιμών πρωτεϊνικών περιεχομένων των εκχυλισμάτων που προκύπτουν από τους διάφορους συνδυασμούς παραμέτρων.

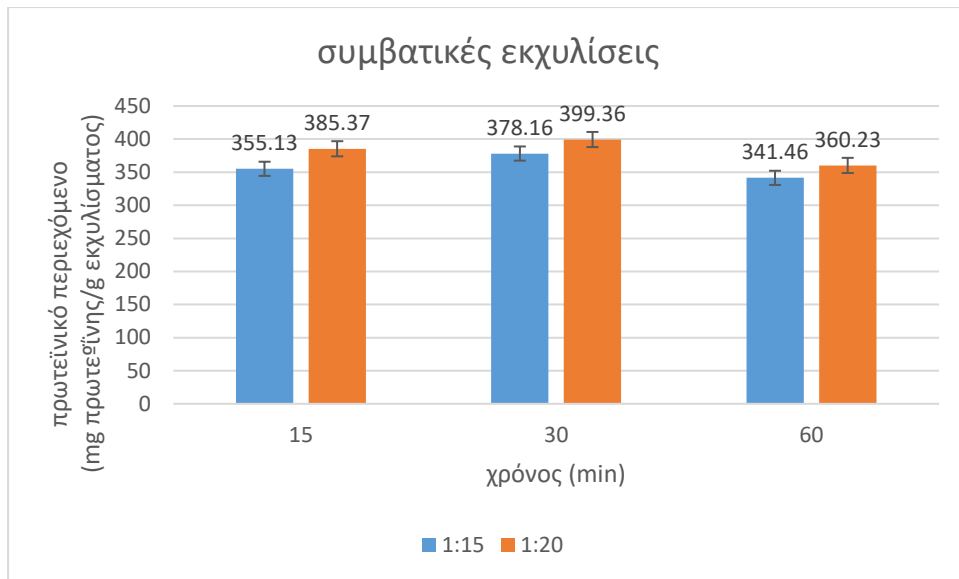
Αρχικά, παρουσιάζονται στον πίνακα 6 τα αποτελέσματα των πειραμάτων που εκτελέστηκαν για τις συμβατικές αλκαλικές εκχυλίσεις.

Πίνακας 6: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων συμβατικών αλκαλικών εκχυλίσεων

εκχύλιση	Αναλογία στερεού προς διαλύτη	Χρόνος (λεπτά)	mg πρωτεΐνης/γραμμάριο εκχυλίσματος
1α	1:15	15	343.75
2α	1:15	30	374.82
3α	1:15	60	330.13
1β	1:15	15	366.51
2β	1:15	30	381.51
3β	1:15	60	352.78
4α	1:20	15	381.12
5α	1:20	30	386.39
6α	1:20	60	353.08
4β	1:20	15	389.61
5β	1:20	30	412.32
6β	1:20	60	367.36

Παρατηρείται ότι στις συμβατικές αλκαλικές εκχυλίσεις για αναλογίες στερεού προς διαλύτη 1:20 επιτυγχάνονται μεγαλύτερες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε σχέση με τις αντίστοιχες 1:15. Όσον αφορά τον χρόνο, παρατηρείται πως στα 30 λεπτά οι αποδόσεις είναι οι μεγαλύτερες, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους οι αποδόσεις μειώνονται ακόμα περισσότερο με αποτέλεσμα να μην έχει νόημα η πραγματοποίηση των εκχυλίσεων για περισσότερη ώρα.

Συγκεντρωτικά, οι αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο των συμβατικών εκχυλίσεων για τις δύο αναλογίες στερεού προς διαλύτη σε κάθε ένα χρονικό διάστημα εκχύλισης εμφανίζονται στο γράφημα 2.



Διάγραμμα 2: Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποδόσεων σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων των συμβατικών εκχυλίσεων

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται οι τιμές πρωτεϊνικού περιεχομένου για τις εκχυλίσεις, οι οποίες υποβοηθούνται από υπερήχους και έχουν αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 9.

Πίνακας 7: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 9

εκχύλιση	χρόνος (λεπτά)	ισχύς (Watt)	mg πρωτεΐνης/γραμμάριο εκχυλίσματος
1A1α	5	450	388.50
1A2α	5	750	395.75
1A1β	5	450	374.99
1A2β	5	750	392.38
1B1α	10	450	395.10
1B2α	10	750	374.23
1B1β	10	450	393.25
1B2β	10	750	374.66
1Γ1α	20	450	370.88
1Γ2α	20	750	357.89
1Γ1β	20	450	365.38
1Γ2β	20	750	337.58

Παρατηρείται ότι σε χρόνους εκχύλισης 10 λεπτών προκύπτουν τα πιο πλούσια σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλίσματα και γίνεται αντιληπτό πως η περαιτέρω αύξηση του χρόνου όχι μόνο δεν ωφελεί, αλλά έχει και αντίστροφα αποτελέσματα. Η αύξηση της ισχύος σε μεγάλες τιμές βοηθά, όπως φαίνεται, μόνο για τους μικρούς χρόνους δηλαδή για τα 5 λεπτά, ενώ εμφανίζει αρνητική επίδραση στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο στους μεγαλύτερους χρόνους εκχυλίσεων.

Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πρωτεϊνικού περιεχομένου για τις υποβοηθούμενες από υπερήχους εκχυλίσεις με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 12.

Πίνακας 8: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 12

εκχύλιση	χρόνος (λεπτά)	ισχύς (Watt)	mg πρωτεΐνης/γραμμάριο εκχυλίσματος
2A1α	5	450	397.60
2A2α	5	750	440.68
2A1β	5	450	352.92
2A2β	5	750	430.01
2B1α	10	450	706.43
2B2α	10	750	695.62
2B1β	10	450	706.04
2B2β	10	750	688.86
2Γ1α	20	450	482.47
2Γ2α	20	750	392.20
2Γ1β	20	450	464.36
2Γ2β	20	750	386.92

Παρατηρείται πως για χρόνους εκχύλισης 10 λεπτών το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων είναι αρκετά υψηλότερο. Γίνεται, επίσης, αντιληπτό πως η αύξηση χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε μείωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Από την άλλη, η επίδραση της ισχύος είναι παρόμοια με αυτήν που παρουσιάζεται για τις εκχυλίσεις της αναλογίας 1:9, δηλαδή τα υψηλά επίπεδα ισχύος έχουν ευεργετική επίδραση μόνο για μικρούς χρόνους εκχύλισης (5 λεπτά), ενώ για χρόνους 10 και 20 λεπτών είναι προτιμότερη η επιλογή μεσαίων επιπέδων ισχύος.

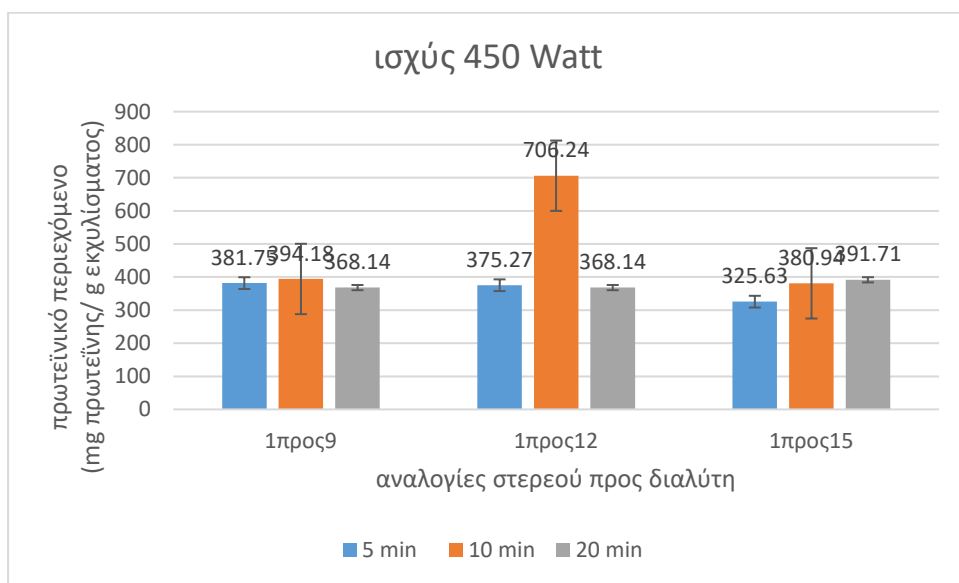
Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πρωτεϊνικού περιεχομένου για τις υποβοηθούμενες από υπερήχους εκχυλίσεις με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15.

Πίνακας 9: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από υπερήχους με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15

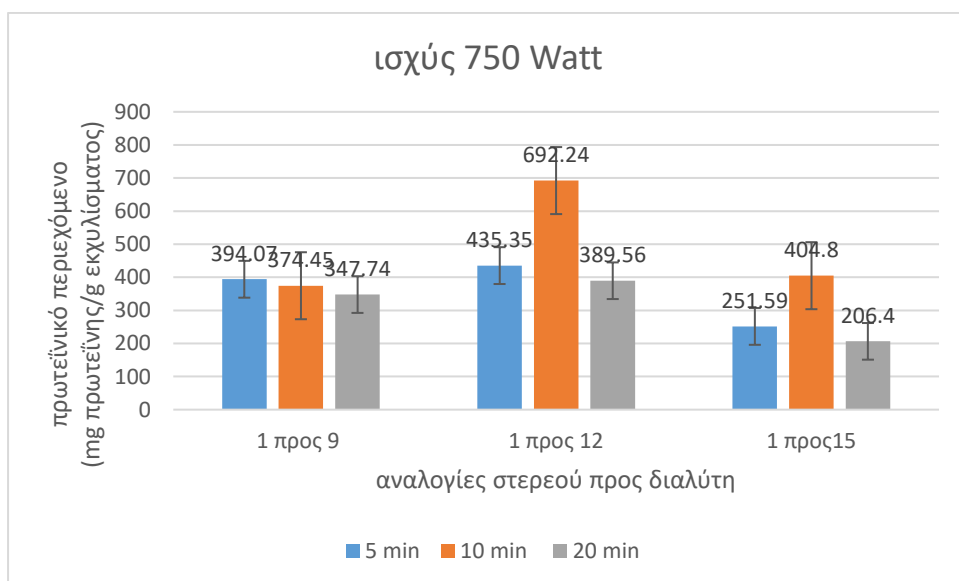
εκχύλιση	χρόνος (λεπτά)	ισχύς (Watt)	mg πρωτεΐνης/γραμμάριο εκχυλίσματος
3A1α	5	450	375.12
3A2α	5	750	255.70
3A1β	5	450	276.14
3A2β	5	750	247.48
3B1α	10	450	382.84
3B2α	10	750	405.53
3B1β	10	450	379.02
3B2β	10	750	404.07
3Γ1α	20	450	376.73
3Γ2α	20	750	221.63
3Γ1β	20	450	406.68
3Γ2β	20	750	191.16

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα και πάλι η μεγάλη αύξηση του χρονικού διαστήματος εκχύλισης δεν οδηγεί σε εκχυλίσματα με αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ενώ εμφανίζεται αντίθετα μια τάση μείωσης. Σε χρόνους 10 λεπτών παρατηρούνται και πάλι τα καλύτερα αποτελέσματα. Όσον αφορά την επίδραση της ισχύος, στην συγκεκριμένη αναλογία στερεού προς διαλύτη, για όλους τους χρόνους εκχύλισης η επίδραση των υψηλών επιπέδων ισχύος είναι αρνητική.

Στα παρακάτω γραφήματα 3, 4 συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τις πρωτεϊνικές περιεκτικότητες των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις υποβοηθούμενες από υπερήχους εκχυλίσεις για κάθε ένα από τα δύο επίπεδα ισχύος ξεχωριστά.



Διάγραμμα 3: περιεχόμενο σε πρωτεΐνη των εκχυλισμάτων για ισχύ υπερήχων 450 Watt



Διάγραμμα 4: περιεχόμενο σε πρωτεΐνη των εκχυλισμάτων για ισχύ υπερήχων 750 Watt

Παρατηρείται πως οι εκχυλίσσεις που υποβοηθούνται από υπερήχους επιτυγχάνουν σε μικρότερους χρόνους αντίστοιχες, αλλά και μεγαλύτερες αποδόσεις σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης με ταυτόχρονη εξοικονόμηση ποσότητας χρησιμοποιούμενου διαλύτη καθώς και χρόνου. Αυτό, δικαιολογείται βιβλιογραφικά, λόγω του τρόπου δράσης των υπερήχων κατά την εκχύλιση, με την μηχανική δόνηση που προκαλείται να αυξάνει την επιφάνεια επαφής μεταξύ διαλύτη και πρώτης ύλης και τις ακουστικές κοιλότητες που προκαλούνται να καταστρέφουν εύκολα και γρήγορα το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων διασπώντας τους μοριακούς δεσμούς. Η απόδοση της διεργασίας αυξάνεται με αυτήν την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας από την πρώτη ύλη στον διαλύτη. Επιπλέον, η μείωση πρωτεϊνικού περιεχομένου για μεγαλύτερους χρόνους παρατηρείται και βιβλιογραφικά, αφού αναφέρεται πως εκτεταμένη αύξηση των παραμέτρων οδηγεί σε αρνητική επίδραση στα αποτελέσματα του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Τέλος, δεν φαίνεται, βιβλιογραφικά, να δοκιμάζονται μεγάλα επίπεδα ισχύος και όπως φαίνεται η αύξηση της ισχύος δεν επιδρά θετικά όσον αφορά την πρωτεϊνική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων. [25]

### 5.1.3.1 στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του λογισμικού Minitab Statistical Software. Συγκεκριμένα, η ανάλυση της επίδρασης των παραμέτρων της εκχύλισης με υπερήχους, αλλά και των παραμέτρων της συμβατικής εκχύλισης στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε εκχυλίσματος έγινε με την τεχνική ANOVA.

Για την απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης πως οι παράμετροι δεν εμφανίζουν συσχέτιση θα πρέπει να παρατηρείται  $p\text{-value} < 0.05$  για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$ . Οι δείκτες  $S$ ,  $R^2$  και  $R^2(\text{adj})$  είναι ενδεικτικοί της προσαρμογής του μοντέλου, με τις την τιμή του  $S$  να επιδιώκεται όσο το δυνατότερο μικρότερη, ενώ για το  $R^2$  επιδιώκονται μεγαλύτερες τιμές ώστε η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα να είναι καλύτερη.

Πίνακας 10 : Στατιστική ανάλυση ANOVA για τις παραμέτρους της συμβατικής εκχύλισης

Analysis of Variance for protein content					
Source	DF	SS	MS	F	P
time	2	2398,5	1199,24	28,06	0,000
ratio	1	674,5	674,45	15,78	0,004
Error	8	341,9	42,74		
Total	11	3414,8			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)			
653,752	89,99%	86,23%			

Στον πίνακα 10 γίνεται ανάδειξη της επίδρασης των διαφορετικών χρόνων εκχύλισης και των διαφορετικών αναλογιών στερεού προς διαλύτη στις τιμές πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων. Η επίδραση είναι σημαντική σύμφωνα με τις μικρές τιμές  $p\text{-value}$  ( $P < 0.05$ ) που εμφανίζονται.

Πίνακας 11 : Στατιστική ανάλυση ANOVA για τις παραμέτρους της εκχύλισης με την τεχνική των υπερήχων

Analysis of Variance for protein content					
Source	DF	SS	MS	F	P
ratio	2	220317	110159	21,51	0,000
time	2	136113	68056	13,29	0,000
power	1	10071	10071	1,97	0,171
Error	30	153647	5122		
Total	35	520147			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)			
715,650	70,46%	65,54%			

Στον πίνακα 11 φαίνεται πως οι διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης και οι διαφορετικές αναλογίες στερεού προς διαλύτη επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, σύμφωνα με τις μικρές τιμές p-value ( $P < 0.05$ ) που εμφανίζονται. Ωστόσο, οι διαφορετικές τιμές ισχύος δεν φαίνεται να επηρεάζουν την απόδοση σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο της διεργασίας αφού εμφανίζεται μεγάλο σχετικό p-value ( $P > 0.05$ ).

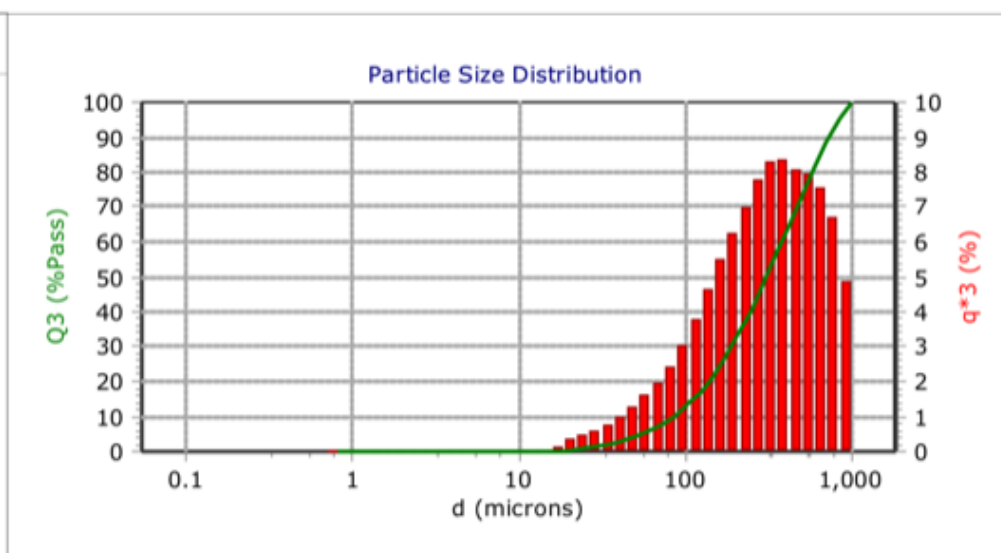
#### 5.1.4 φυσικοχημικές μετρήσεις

##### 5.1.4.1 διακύμανση μεγέθους σωματιδίων

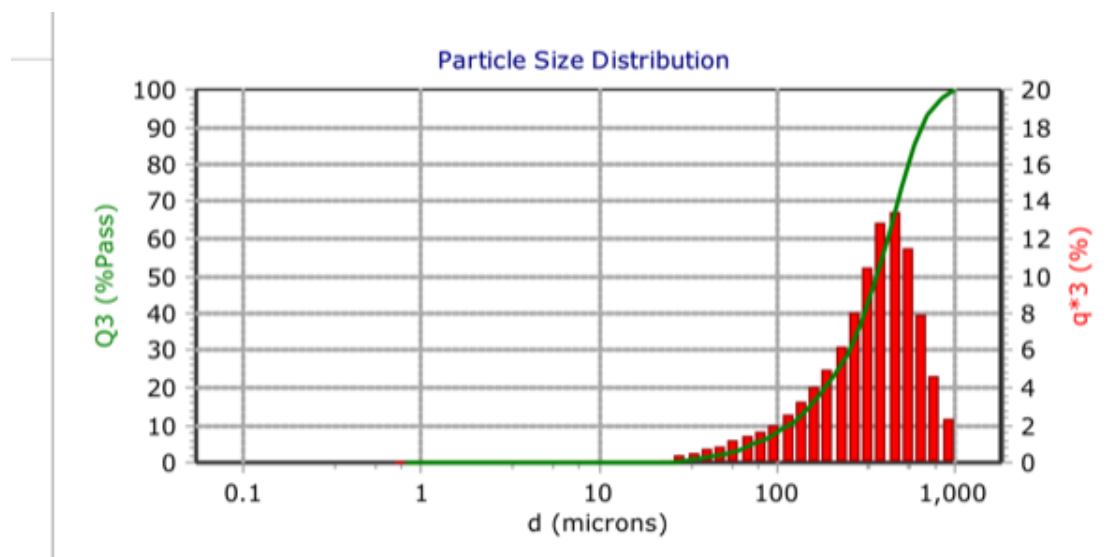
Για την ανάλυση της διακύμανσης του μεγέθους των σωματιδίων των εκχυλισμάτων, επιλέγεται δείγμα εκχυλίσματος συμβατικής αλκαλικής εκχύλισης και ένα δείγμα εκχυλίσματος εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Οι παράμετροι κάθε εκχύλισης ήταν συγκεκριμένα οι εξής:

- Συμβατική: αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15, χρονικό διάστημα εκχύλισης μία ώρα.
- Με υπερήχους: αναλογία στερεού προς διαλύτη 1 προς 15, χρονικό διάστημα εκχύλισης 10 λεπτών και ισχύς 450 Watt.

Στα παρακάτω διαγράμματα 5,6 φαίνεται η διακύμανση του μεγέθους των σωματιδίων, συγκεκριμένα του μεγέθους των διαμέτρων τους για κάθε δείγμα αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5: διακύμανση μεγέθους σωματιδίων για εκχύλιση με επίδραση υπερήχων



Διάγραμμα 6: διακύμανση μεγέθους σωματιδίων για εκχύλιση συμβατικής εκχύλισης

Από τα διαγράμματα γίνεται φανερό πως τα σωματίδια του εκχυλίσματος που προέκυψε με την βοήθεια της τεχνολογίας υπερήχων είναι μικρότερα από τα αντίστοιχα της συμβατικής εκχύλισης. Αυτό αποδεικνύεται και από τις τιμές της μέσης διαμέτρου σε κάθε περίπτωση, οι οποίες είναι αντίστοιχα σε μικρόμετρα 377.1(συμβατική) και 359.7 (υπερήχων).

Οι υπέρηχοι προκαλούν σπηλαίωση και μηχανική δόνηση, με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα να διασπώνται και με αυτόν τον τρόπο να παρατηρούνται συνολικά περισσότερα σωματίδια μικρότερης διαμέτρου. [30]

#### 5.1.4.2 δυνατότητες κατακράτησης νερού και ελαίου

Αρχικά, γίνεται η σύγκριση κατακράτησης νερού για τα δυο δείγματα εκχυλισμάτων, εκ των οποίων το ένα έχει προκύψει με την μέθοδο της συμβατικής μεθόδου αλκαλικής εκχύλισης, ειδικότερα για χρόνο εκχύλισης μίας ώρας με αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:15 και το άλλο

με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, συγκεκριμένα με χρόνο εκχύλισης 10 λεπτών, αναλογία στερεού προς διαλύτη 1:12 και με ισχύ υπερήχων 450 Watt. Η δυνατότητα κατακράτησης νερού ( water holding capacity WHC) εκφράζεται σε γραμμάρια νερού που δεσμεύονται ανά γραμμάριο δείγματος εκχυλίσματος.

Στον πίνακα 12 αναφέρονται οι τιμές της ικανότητας κατακράτησης νερού για τα δύο εκχυλίσματα

Πίνακας 12: Μετρήσεις δυνατότητας κατακράτησης νερού εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με υπερήχους

εκχύλισμα	WHC (g/g)
συμβατικής	1.47
Με υπερήχους	1.65

Γίνεται αντιληπτό πως το εκχύλισμα που έχει προκύψει με την εκχύλιση που χρησιμοποιεί την τεχνολογία υπερήχων παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα κατακράτησης νερού. Επιπλέον, πρωτεΐνες με WHC στο εύρος τιμών 1.49–4.72 g/g είναι κατάλληλες να προστεθούν σε κολλώδη τρόφιμα. Επομένως, το εκχύλισμα που προκύπτει, στην περίπτωση αυτή, μπορεί να αξιοποιηθεί από την βιομηχανία τροφίμων. [31]

Με τον ίδιο τρόπο, για το ίδιο ζευγάρι δειγμάτων γίνεται η σύγκριση της δυνατότητας κατακράτησης ελαίου (oil holding capacity, OHC) και συγκεκριμένα ηλιελαίου.

Στον πίνακα 13 αναφέρονται οι τιμές της ικανότητας κατακράτησης ελαίου για τα δύο εκχυλίσματα.

Πίνακας 13: Μετρήσεις δυνατότητας κατακράτησης νερού εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με υπερήχους

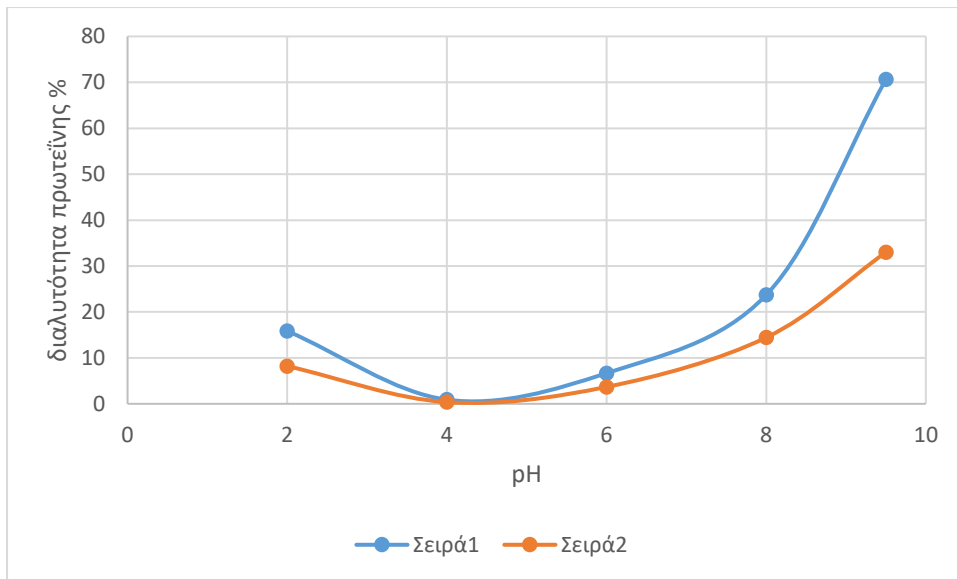
εκχύλισμα	OHC (g/g)
συμβατικής	0.42
Με υπερήχους	7.43

Το εκχύλισμα που προκύπτει από την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση παρουσιάζει, επίσης, καλύτερη δυνατότητα κατακράτησης ελαίου. Το αποτέλεσμα, αυτό, ήταν αναμενόμενο, αφού με την επίδραση των υπερήχων όλο και περισσότερες υδρόφοβες περιοχές εκτίθενται και έτσι το εκχύλισμα που προκύπτει δεσμεύει ευκολότερα τα λίπη. Συνεπώς, η επίδραση των υπερήχων και ως προς και αυτή την λειτουργική ιδιότητα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευεργετική. [25], [32]

#### 5.1.4.3 Διαλυτότητα πρωτεϊνών

Στο διάγραμμα 7 φαίνεται η μεταβολή της % διαλυτότητας των πρωτεϊνών σε σχέση με το pH.





Διάγραμμα 7: Μεταβολή της % διαλυτότητας των πρωτεϊνών σε σχέση με το pH

Στα βασικότερα pH παρατηρείται αυξημένη διαλυτότητα σε σχέση με τα πιο όξινα, Στην περιοχή pH κοντά στο 4 παρατηρείται μια απότομη μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, η οποία οφείλεται πιθανότατα σε μειωμένα φορτία των πρωτεϊνών που συνδέονται με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων, τα οποία δεν είναι εύκολο να διαλυθούν. Αυτό συμβαίνει, διότι εκεί παρατηρείται το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών όπου σχηματίζονται τα μέγιστα αντίθετα φορτία μεταξύ των μορίων, ώστε αυτά να υφίστανται ισχυρές ελκτικές δυνάμεις με αποτέλεσμα την συσσωμάτωσή τους και συνεπώς την μείωση της διαλυτότητάς τους στον ελάχιστο βαθμό. [33], [34]

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν απομονωθεί με την τεχνική εκχύλισης με υπερήχους είναι αυξημένη σε σχέση με αυτήν των πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με την συμβατική μέθοδο αλκαλικής εκχύλισης, σε κάθε αντίστοιχη τιμή pH. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η επίδραση των υπερήχων οδηγεί στον σχηματισμό μορίων μικρότερου μεγέθους, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την αλληλεπίδρασή τους με τα μόρια του νερού και αυξάνοντας, κατά συνέπεια, την διαλυτότητα των πρωτεϊνών. [25], [35]

## 5.2 μετρήσεις εκχυλισμάτων γαλακτοολιγοσακχαριτών

### 5.2.1 μετρήσεις ξηρού εκχυλίσματος

Σε όλες τις εκχυλίσεις η αναλογία ποσότητας στερεού προς τον όγκο του χρησιμοποιούμενου διαλύτη είναι 1 προς 20.

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα των υδατικών εκχυλίσεων.

Πίνακας 14: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα υδατικών εκχυλίσεων

εκχυλίσεις	θερμοκρασία (°C)	χρόνος (min)	απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
A1	25	15	24.64
A2	25	30	27.35
A3	25	60	34.13
A4	50	15	17.73

A5	50	30	19.56
A6	50	60	20.18

Στους 25 °C εμφανίζονται μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης, ενώ αύξηση της απόδοσης σε ξηρό εκχύλισμα παρατηρείται και όσο μεγαλώνει το χρονικό διάστημα εκχύλισης. Τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν μεγάλες αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα, ωστόσο όπως γίνεται αντιληπτό στην ποσοτική ανάλυση εμφανίζουν μηδενικό περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες.

Στον πίνακα 15 εμφανίζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα των αιθανολικών εκχυλίσεων.

Πίνακας 15: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα αιθανολικών εκχυλίσεων

εκχυλίσεις	θερμοκρασία (°C)	χρόνος (min)	απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
B1	25	15	2.89
B2	25	30	3.05
B3	25	60	5.93
B4	50	15	4.65
B5	50	30	5.54
B6	50	60	10.38

Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και χρόνους παρατηρείται μια αύξηση στις αποδόσεις των εκχυλίσεων. Οι αποδόσεις των αιθανολικών εκχυλίσεων είναι σχετικά μικρές, ενώ όπως θα διαπιστωθεί και στον ποσοτικό έλεγχο δεν επιτυγχάνεται η ανάκτηση γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Στον πίνακα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 60-40.

Πίνακας 16: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 60-40

εκχυλίσεις	θερμοκρασία (°C)	χρόνος (min)	απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
Γ1	25	15	12.26
Γ2	25	30	14.39
Γ3	25	60	14.19
Γ4	50	15	16.87
Γ5	50	30	18.06
Γ6	50	60	17.48

Με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνονται οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων. Επιπλέον, σε χρονικά διαστήματα εκχύλισης 10 λεπτών εμφανίζονται οι καλύτερες τιμές αποδόσεων. Οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 60-40 είναι οι μεγαλύτερες.

Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 75-25.

Πίνακας 17: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 75-25

εκχυλίσεις	θερμοκρασία (°C)	χρόνος (min)	απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
Δ1	25	15	6.33
Δ2	25	30	8.29
Δ3	25	60	12.11
Δ4	50	15	11.78
Δ5	50	30	13.99
Δ6	50	60	14.63

Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και χρόνους παρατηρείται μια αύξηση στις αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων για τις εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού αναλογίας 75-25

Στον πίνακα 18 παρουσιάζονται οι αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα των εκχυλίσεων που υποβοηθούνται από μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 250 Watt.

Πίνακας 18: Αποδόσεις σε ξηρό εκχύλισμα εκχυλίσεων που πραγματοποιούνται υπό την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας

εκχυλίσεις	θερμοκρασία (°C)	χρόνος (min)	απόδοση % σε ξηρό εκχύλισμα
MAE 1	50	5	15.69
MAE 2	50	10	16.45
MAE 3	50	20	15.80

Παρατηρείται πως η καλύτερη απόδοση σε ξηρό εκχύλισμα για τις εκχυλίσεις που υποβοηθούνται από μικροκυματική ακτινοβολία παρατηρείται για χρόνο 10 λεπτών. Επιτυγχάνονται σχετικά παρόμοιες αποδόσεις σε μικρότερους χρόνους, ενώ όπως φαίνεται στην ποσοτική ανάλυση το περιεχόμενο και η καθαρότητα σε GOS είναι πολύ βελτιωμένο σε σχέση με τις αντίστοιχες συμβατικές SLE.

## 5.2.2 ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων γαλακτοολιγοσακχαριτών

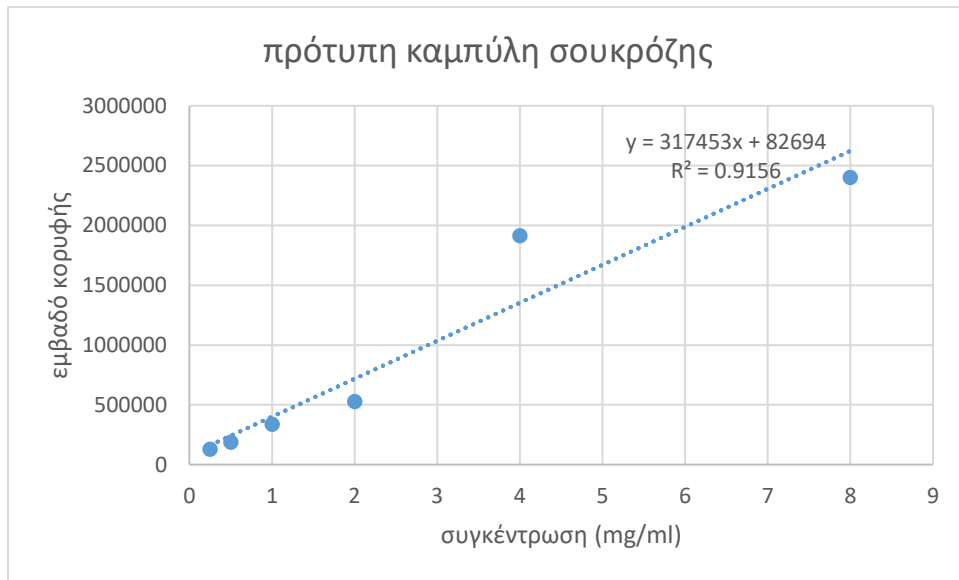
### 5.2.2.1 καμπύλες αναφοράς πρότυπων σακχάρων

Για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, πρώτα γίνεται η ανάλυση των χρωματογραφημάτων για τα διάφορα διαλύματα πρότυπων σακχάρων, τα οποία προμηθεύτηκαν, ώστε να γίνουν οι αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες αναφοράς. Τα διαθέσιμα πρότυπα σάκχαρα ήταν η σουκρόζη, η σταχυόζη και η ραφφινόζη. Τα σάκχαρα διαλύθηκαν σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- νερό σε αναλογία 75:25 σε συγκεντρώσεις 8,4,2,1,0.5 και 0.25 mg/ml. Στα διαγράμματα 8,9 και 10 φαίνονται οι καμπύλες αναφοράς για τα σάκχαρα σουκρόζη, σταχυόζη και ραφφινόζη αντίστοιχα.

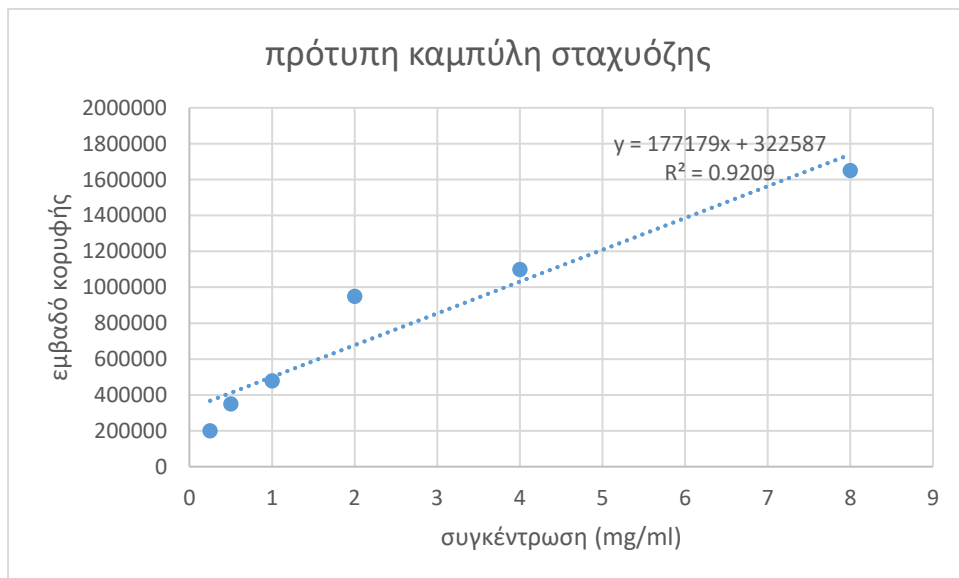
Οι χρόνοι έκλουσης για το κάθε σάκχαρο παρουσιάζονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: χρόνοι έκλυσης πρότυπων σακχάρων

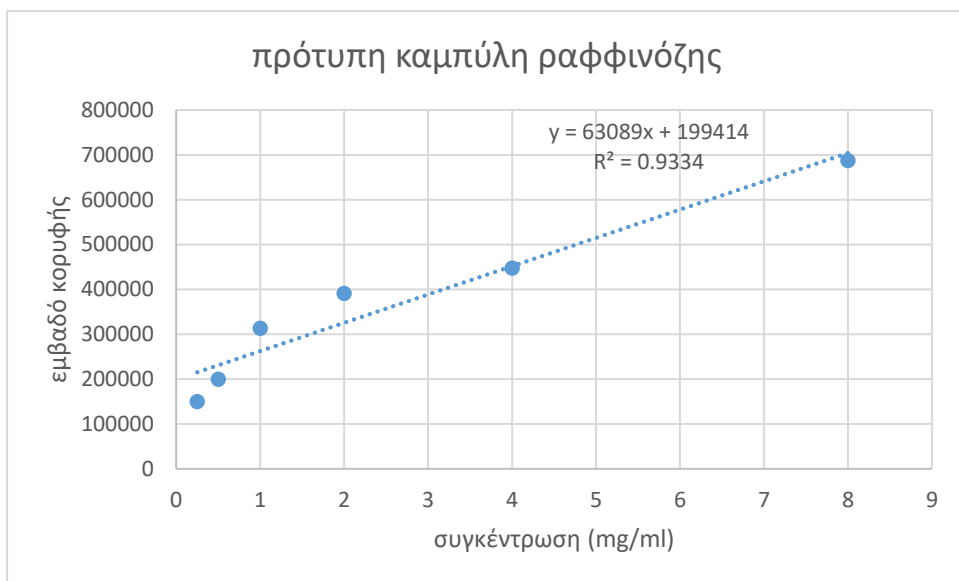
σάκχαρο	Χρόνος έκλυσης (min)
Σουκρόζη	10.13
Σταχυόζη	6.52
ραφφινόζη	18.48



Διάγραμμα 8: πρότυπη καμπύλη αναφοράς σουκρόζης



Διάγραμμα 9: πρότυπη καμπύλη αναφοράς σταχυόζης

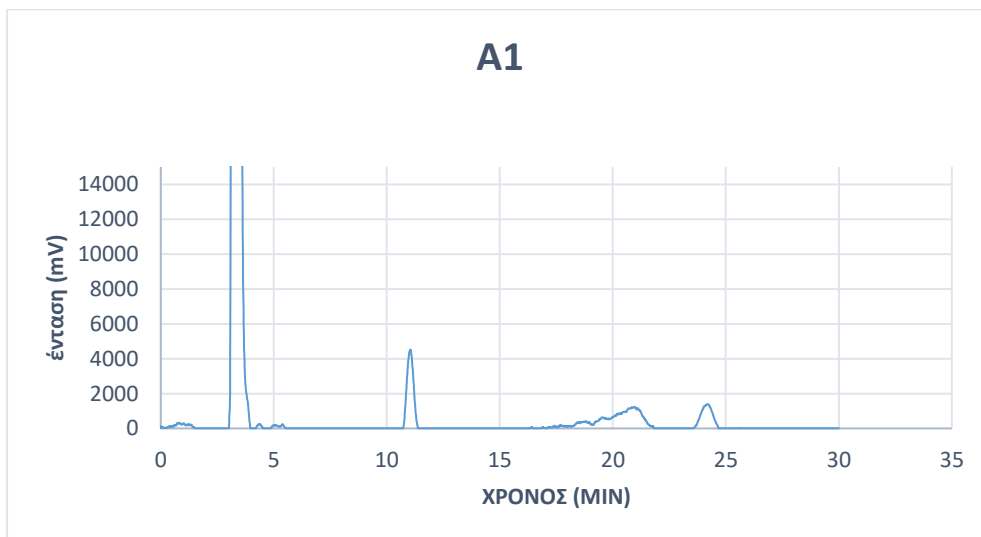


Διάγραμμα 10: πρότυπη καμπύλη αναφοράς ραφφινόζης

#### 5.2.2.2 ποιοτική ανάλυση εκχυλισμάτων

Προτού γίνει η ποσοτικοποίηση των απομονωμένων γαλακτοολιγοσακχαριτών, γίνεται η αναγνώρισή τους μέσα από την ανάλυση των χρωματογραφήματων για όλες τις περιπτώσεις εκχυλισμάτων.

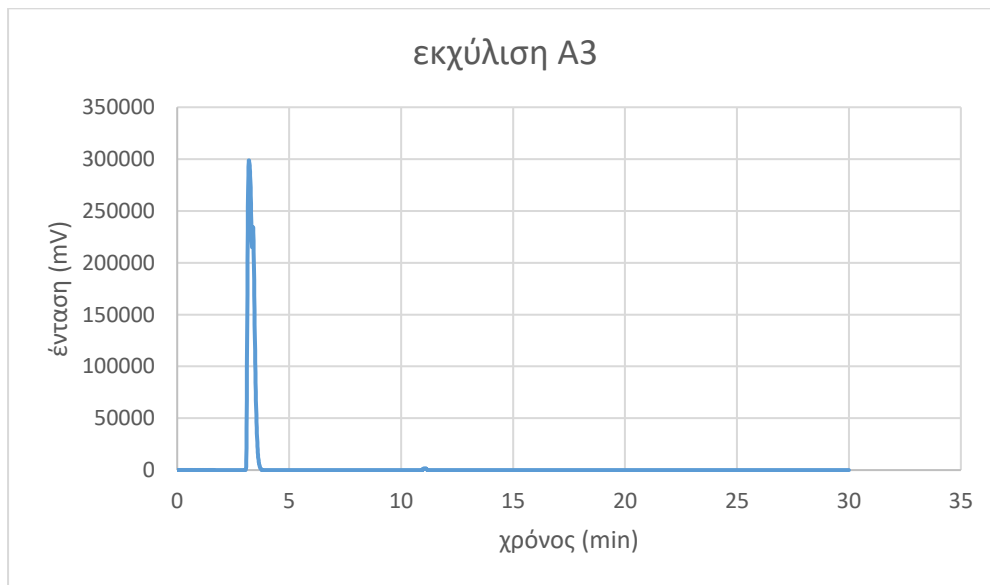
Αρχικά, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των υδατικών εκχυλισμάτων.



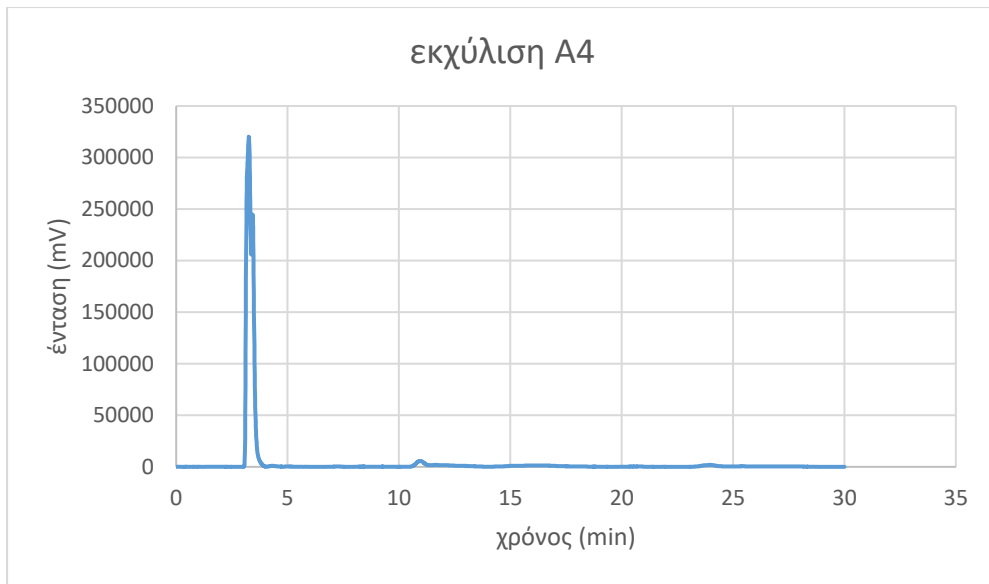
Διάγραμμα 11: χρωματογράφημα εκχυλίματος υδατικής εκχύλισης A1



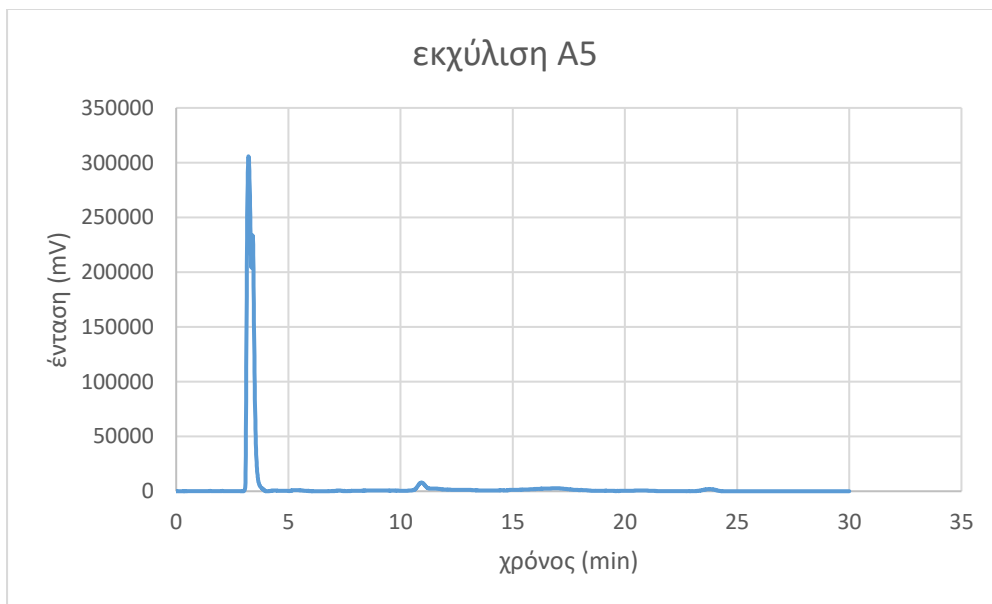
Διάγραμμα 12: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης Α2



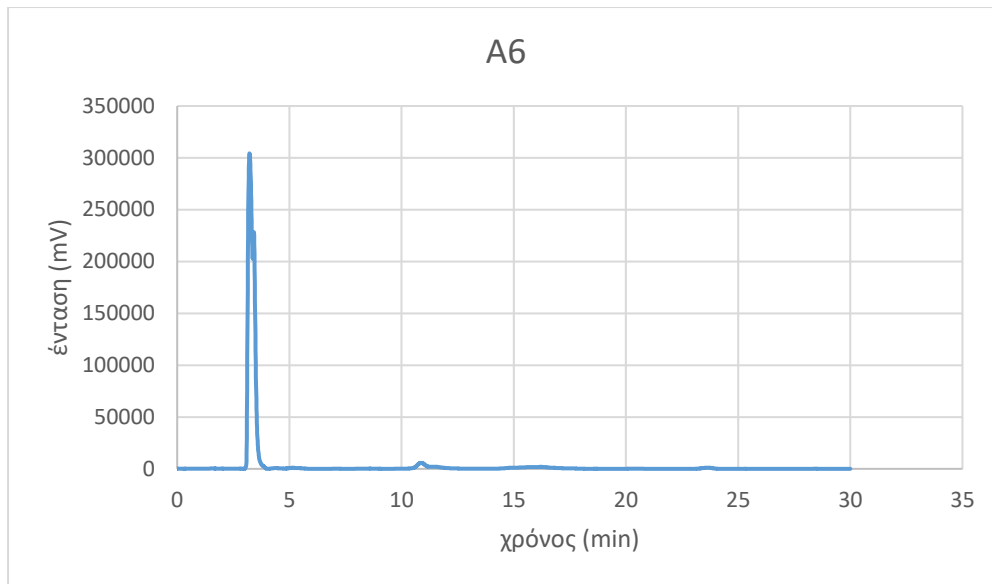
Διάγραμμα 13: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης Α3



Διάγραμμα 14: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A4



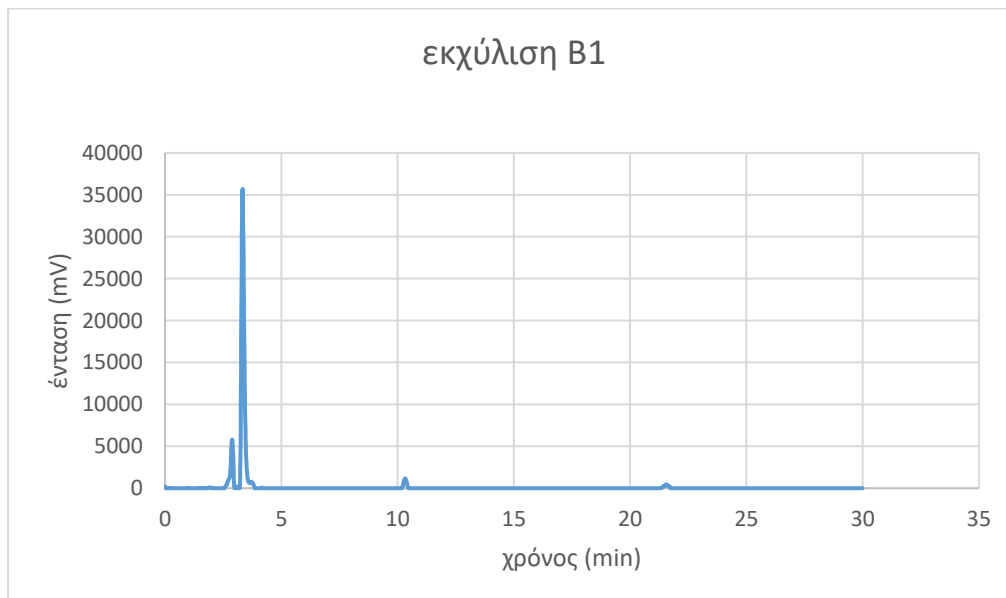
Διάγραμμα 15: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A5



Διάγραμμα 16: χρωματογράφημα εκχυλίσματος υδατικής εκχύλισης A6

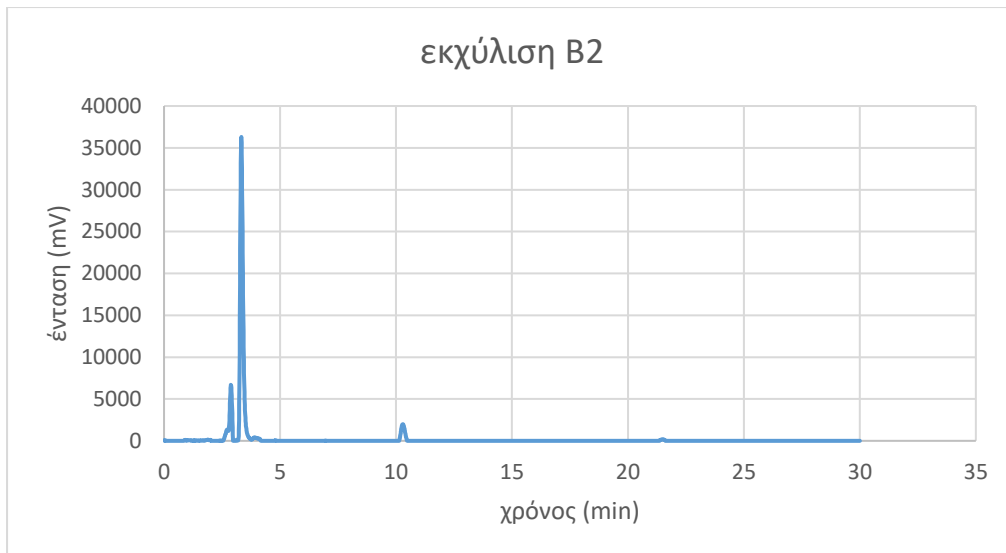
Παρατηρείται, πως οι εκχυλίσες που χρησιμοποιούν ως διαλύτη αποκλειστικά νερό, δεν παρουσιάζουν την δυνατότητα ανάκτησης κάποιου γαλακτοολιγοσακχαρίτη, καθώς το μοναδικό σάκχαρο που αναγνωρίζεται είναι η σουκρόζη με βάση τον χρόνο έκλουσης της.

Έπειτα, εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα των αιθανολικών εκχυλισμάτων.

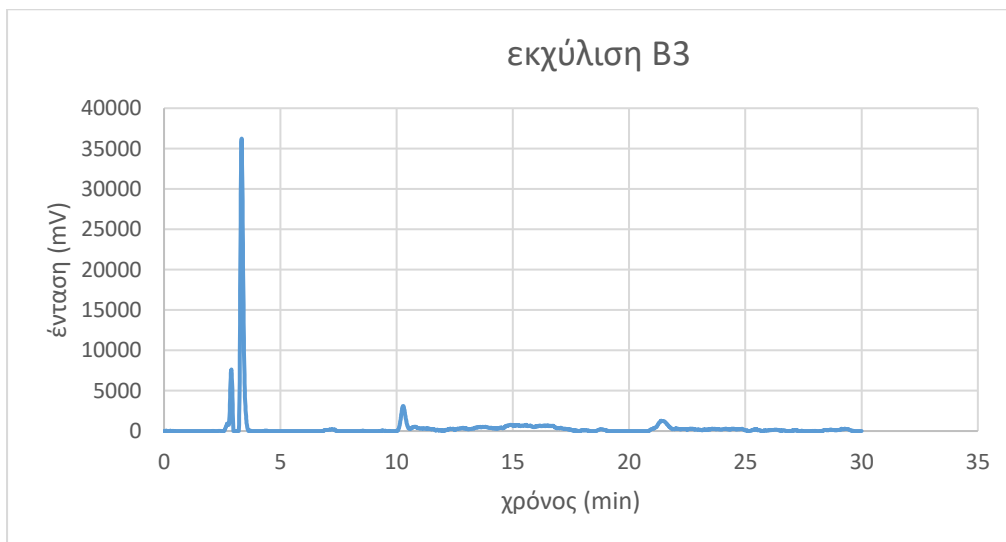


Διάγραμμα 17: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B1

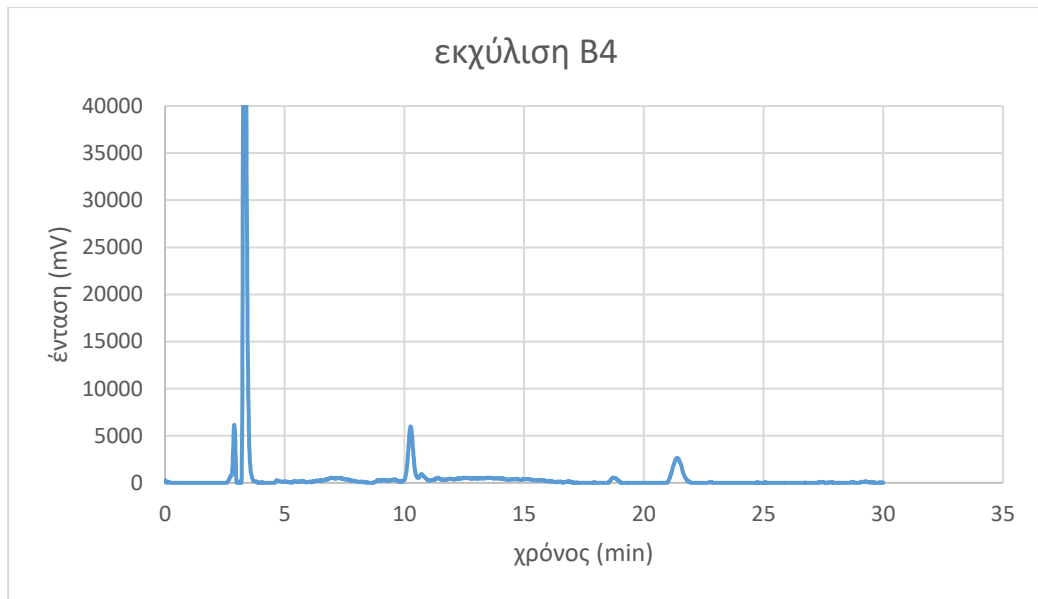




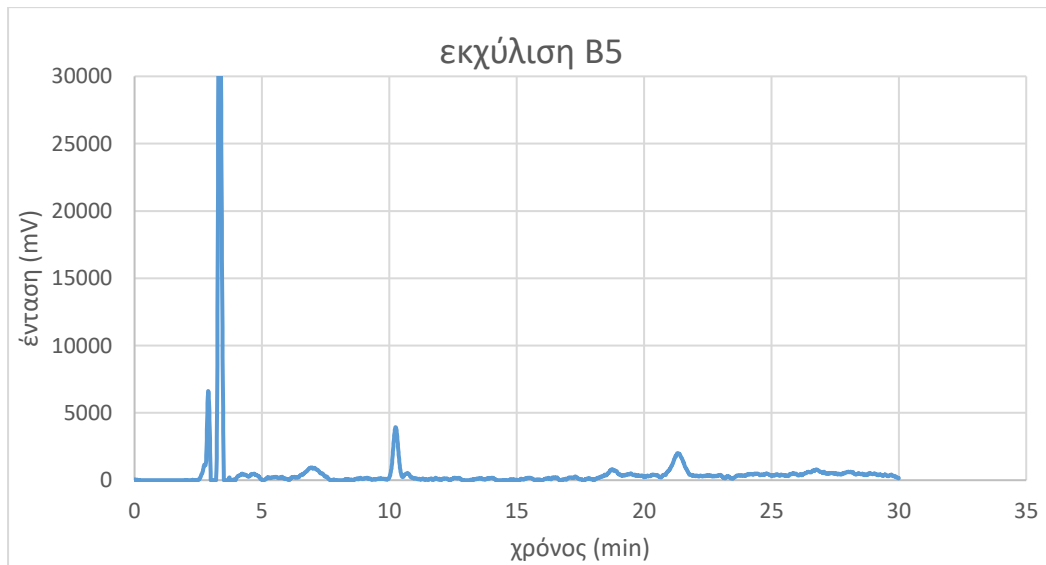
Διάγραμμα 18: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B2



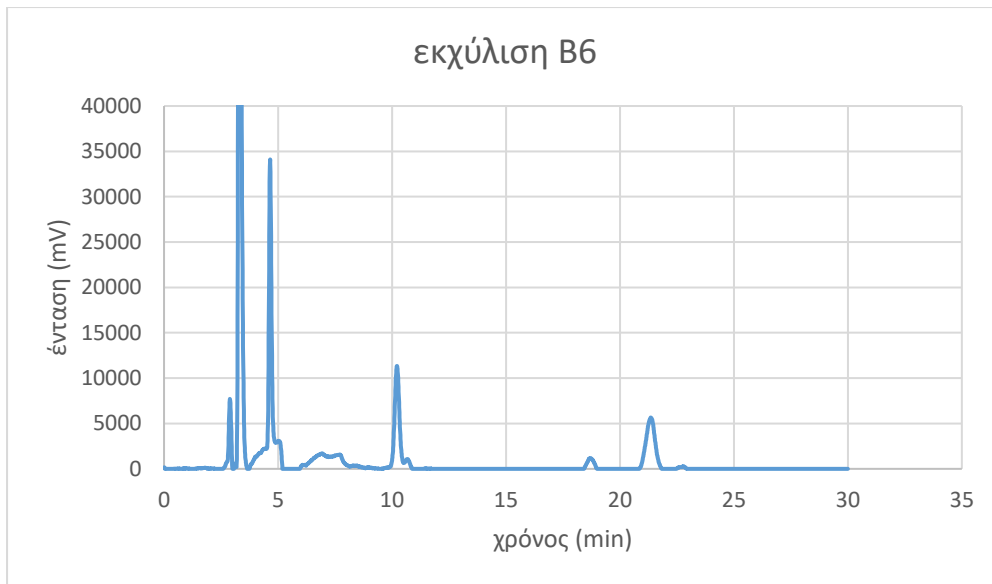
Διάγραμμα 19: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B3



Διάγραμμα 20: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B4



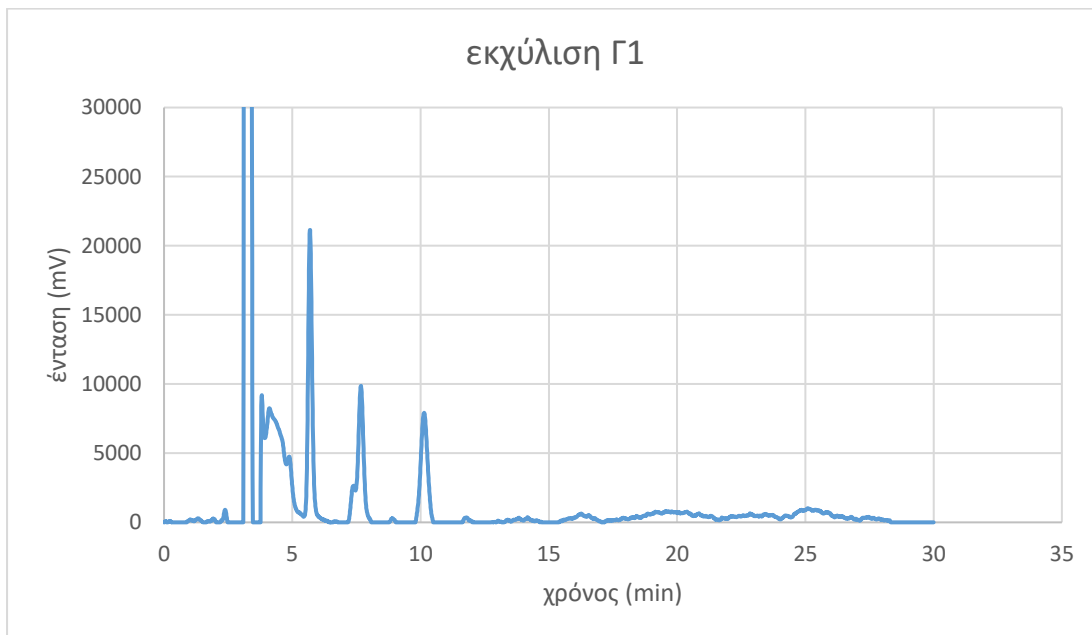
Διάγραμμα 21: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B5



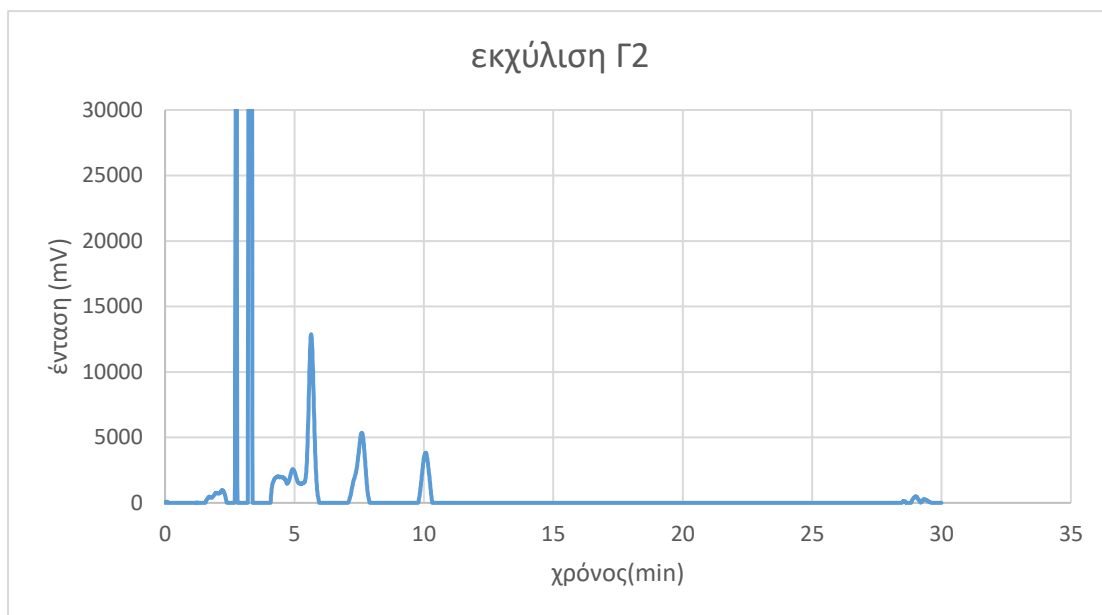
Διάγραμμα 22: χρωματογράφημα εκχυλίσματος αιθανολικής εκχύλισης B6

Παρατηρείται ότι για τις εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτη αποκλειστικά αιθανόλη δεν οδηγούν στην απομόνωση κάποιου γαλακτοολιγοσακχαρίτη, με εξαίρεση ίσως των εκχυλίσεων B5 και B6 (30, 60 λεπτών στους 50 °C), οι οποίες εμφανίζουν κάποια ίχνη σταχυόζης και ραφφινόζης στους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης, μαζί με ένα επιπλέον σάκχαρο που εμφανίζεται σε χρόνο μετά τα 20 λεπτά, το οποίο ίσως να αποτελεί την σισσεριτόλη.[36]

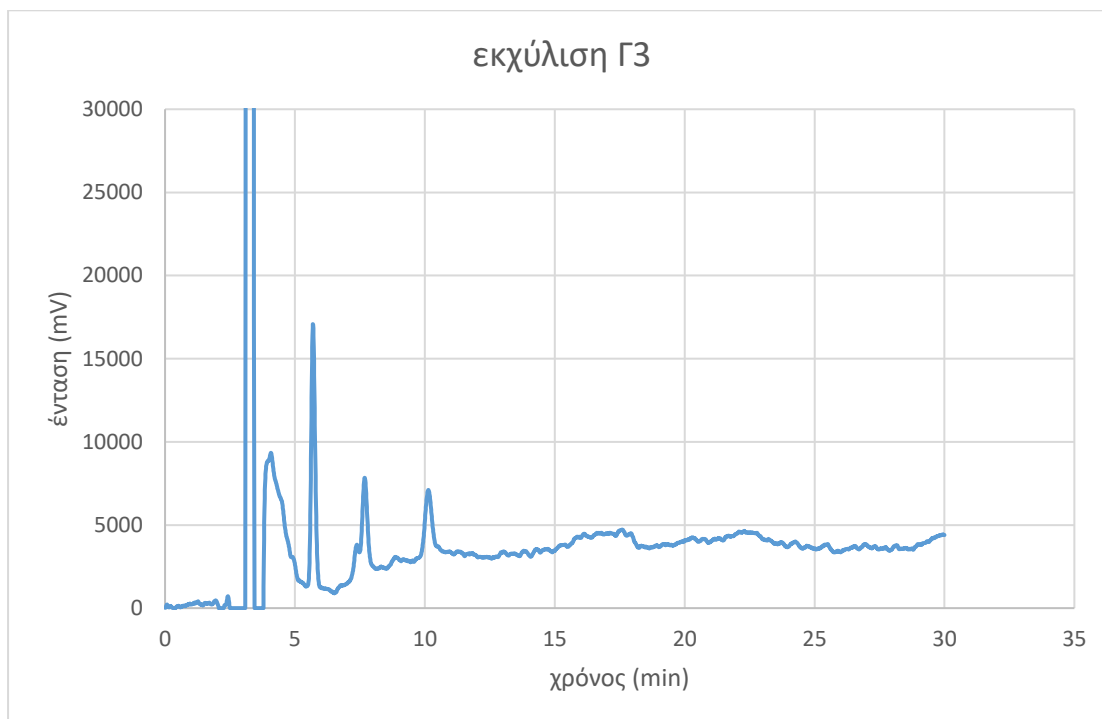
Στην συνέχεια, εμφανίζονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα για τις εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτη το μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40.



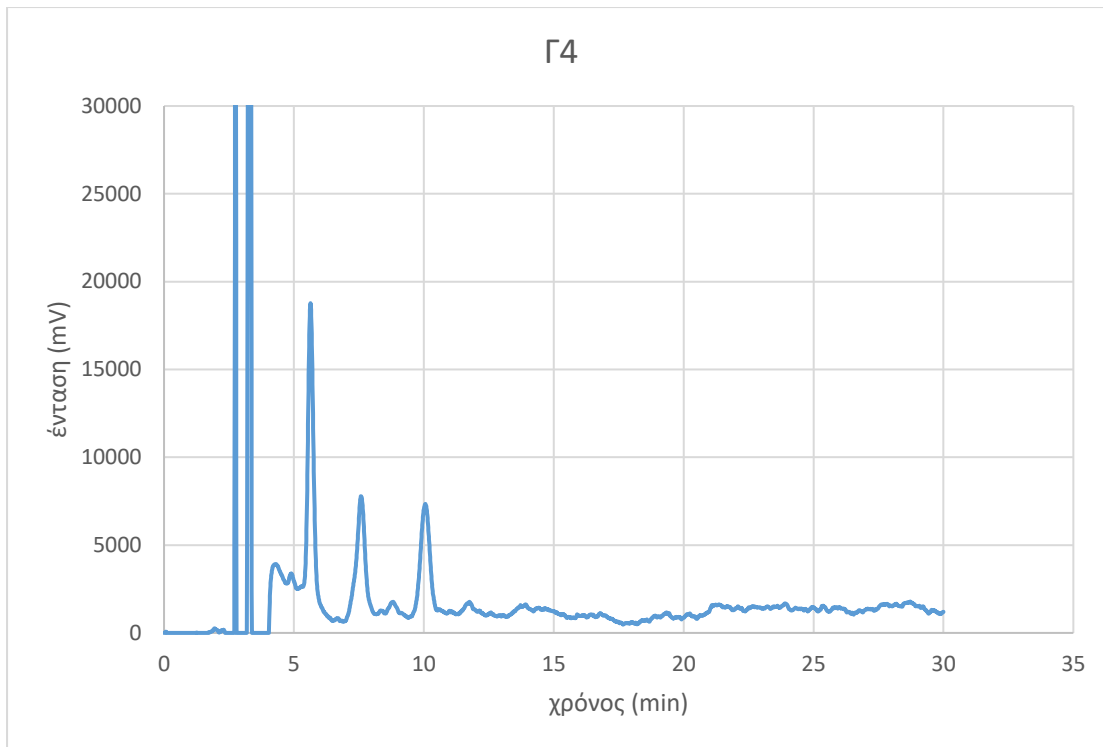
Διάγραμμα 23: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ1



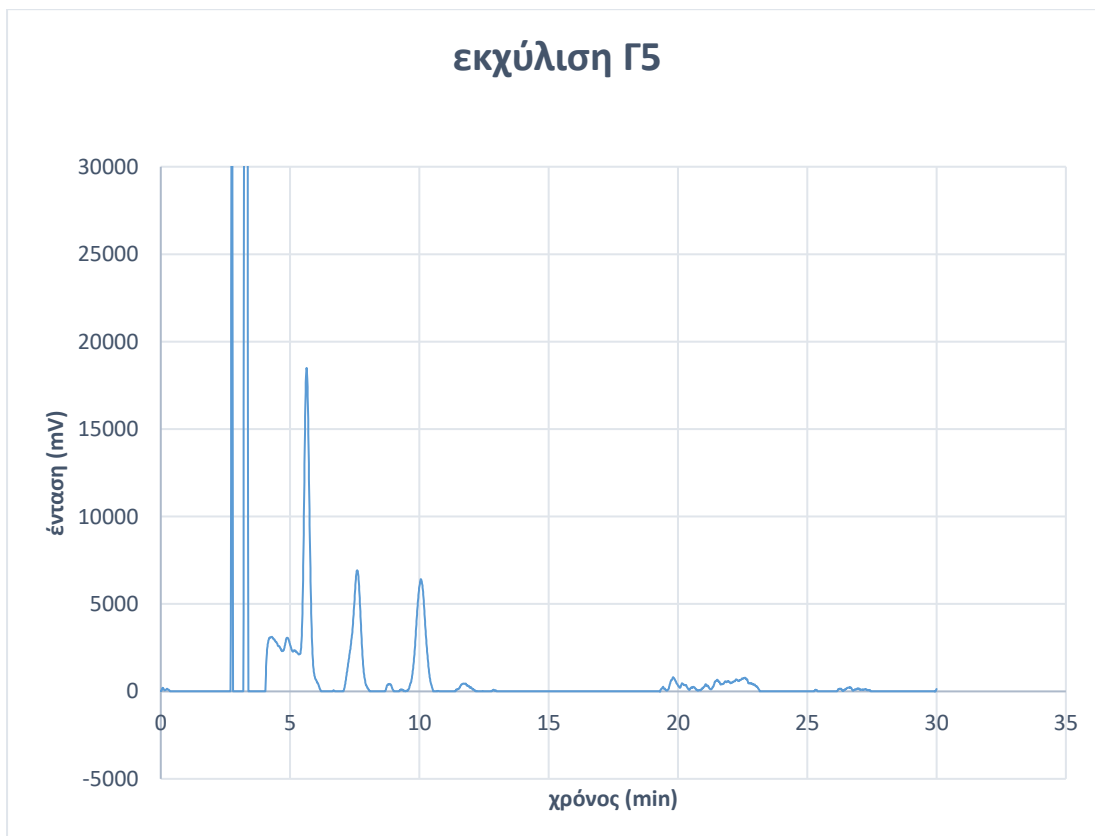
Διάγραμμα 24: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ2



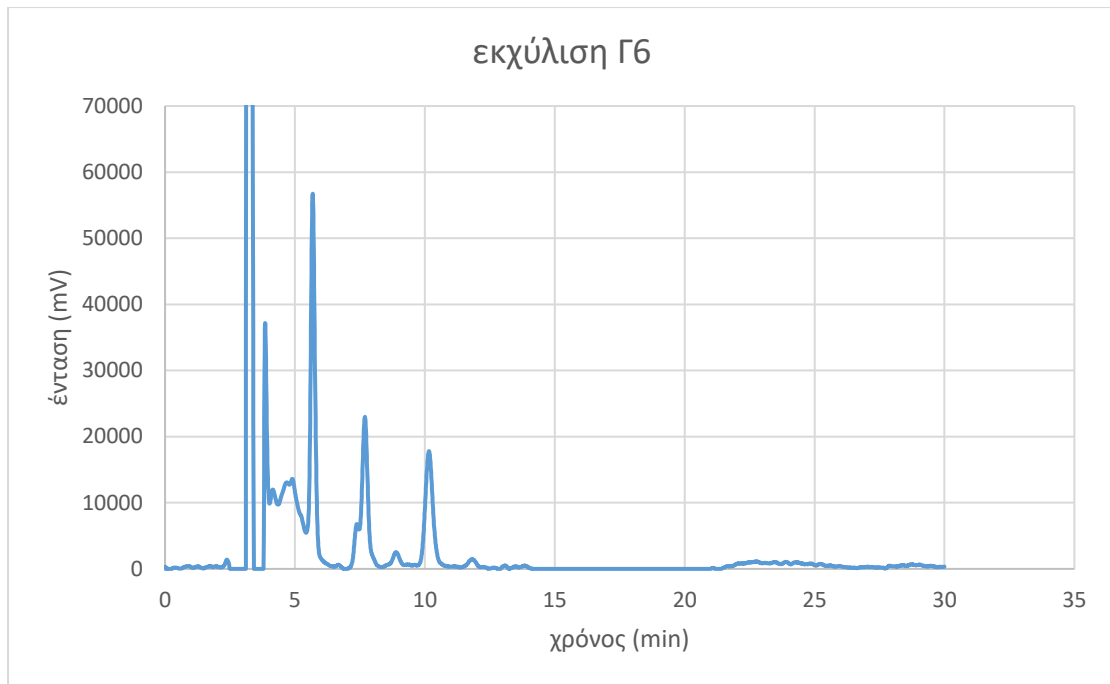
Διάγραμμα 25: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ3



Διάγραμμα 25: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ4



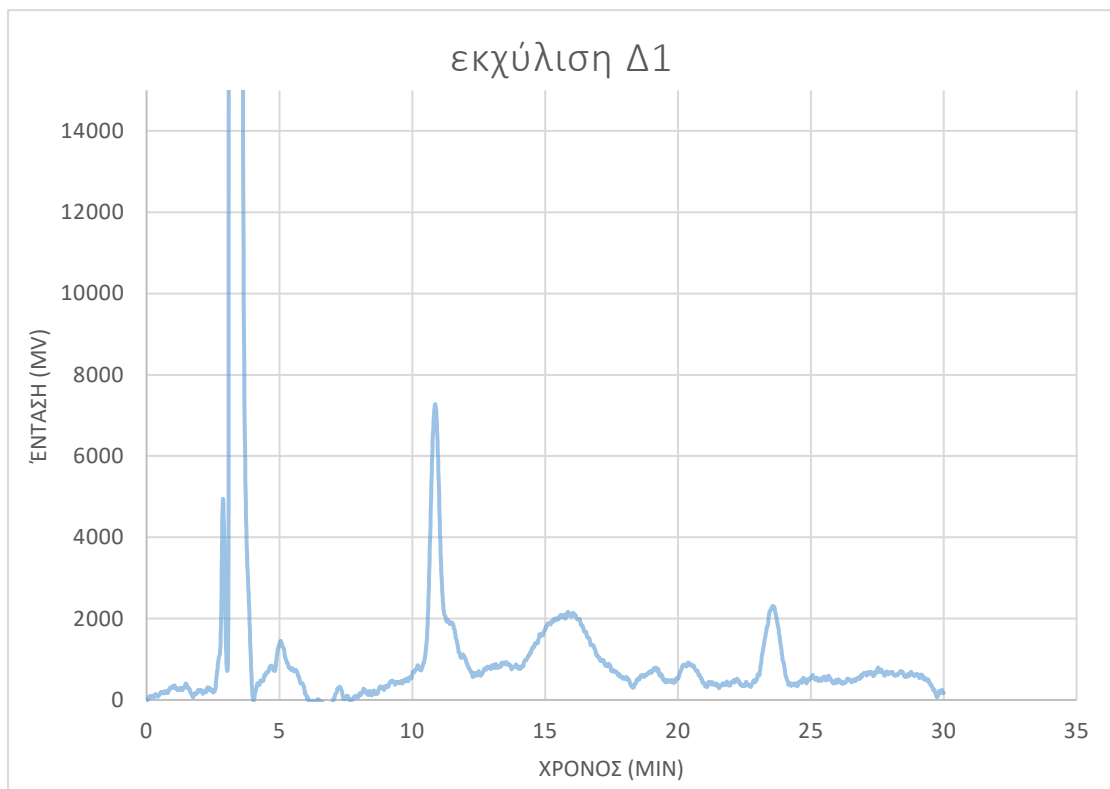
Διάγραμμα 26: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ5



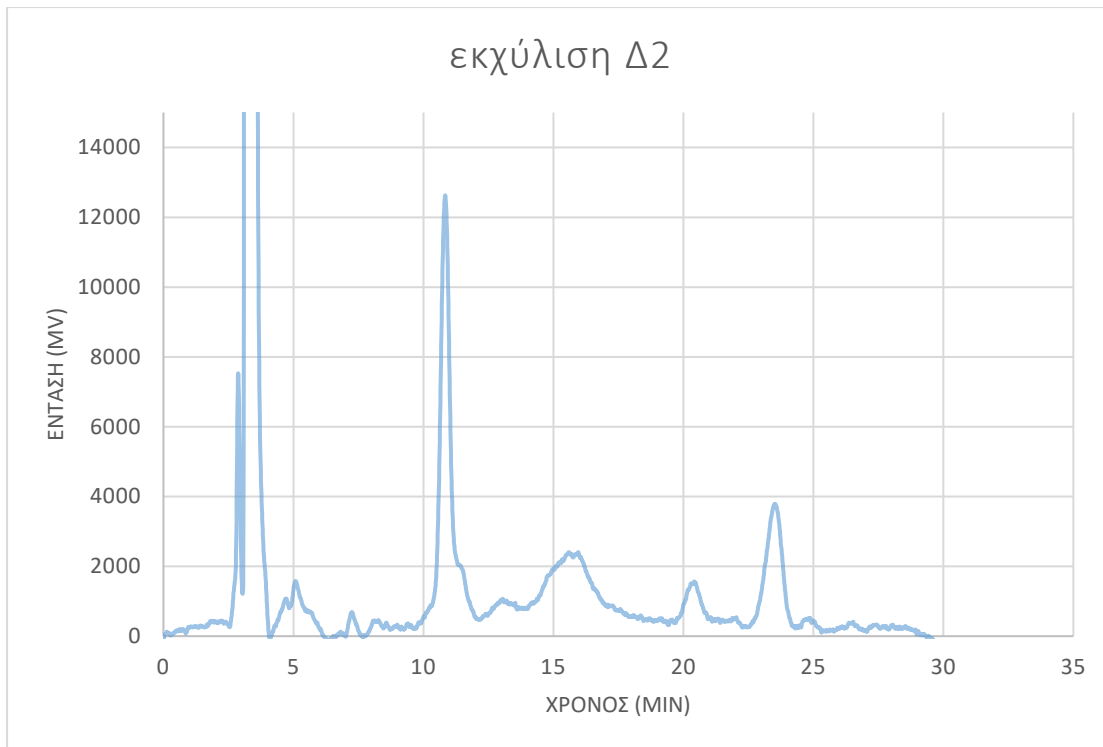
Διάγραμμα 27: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 60:40 Γ6

Παρατηρείται πως οι εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν διαλύτη το μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40 επιτυγχάνουν την απομόνωση σταχυόζης. Εκλούνται , επίσης, σουκρόζη και ένα επιπλέον σάκχαρο σε χρόνο περίπου στα 7.7 λεπτά, το οποίο δεν μπορεί να αναγνωρισθεί με σιγουριά.

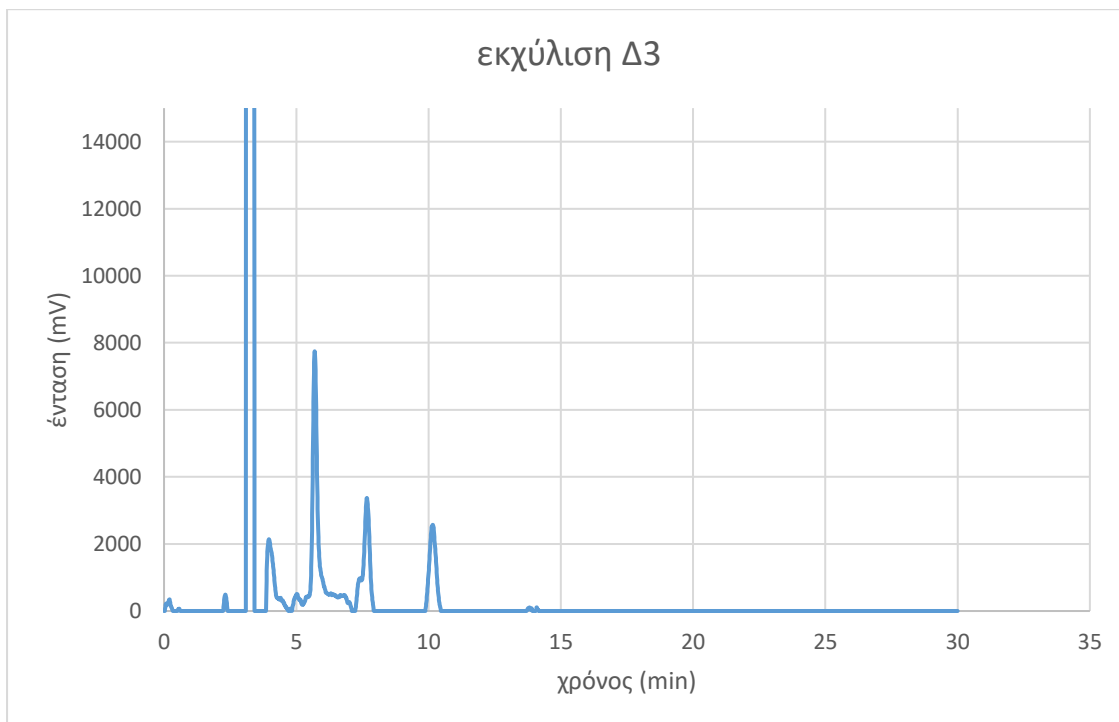
Τα παρακάτω χρωματογραφήματα αφορούν τις εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτη το μίγμα αιθανόλης-νερού 75:25.



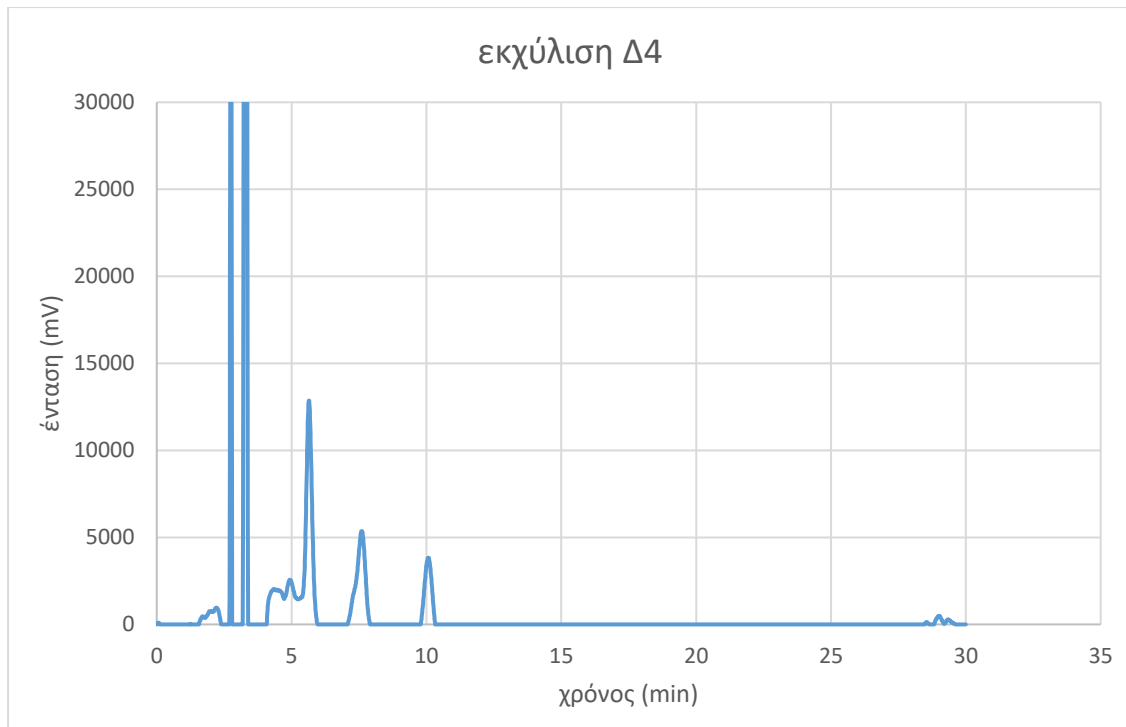
Διάγραμμα 28: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ1



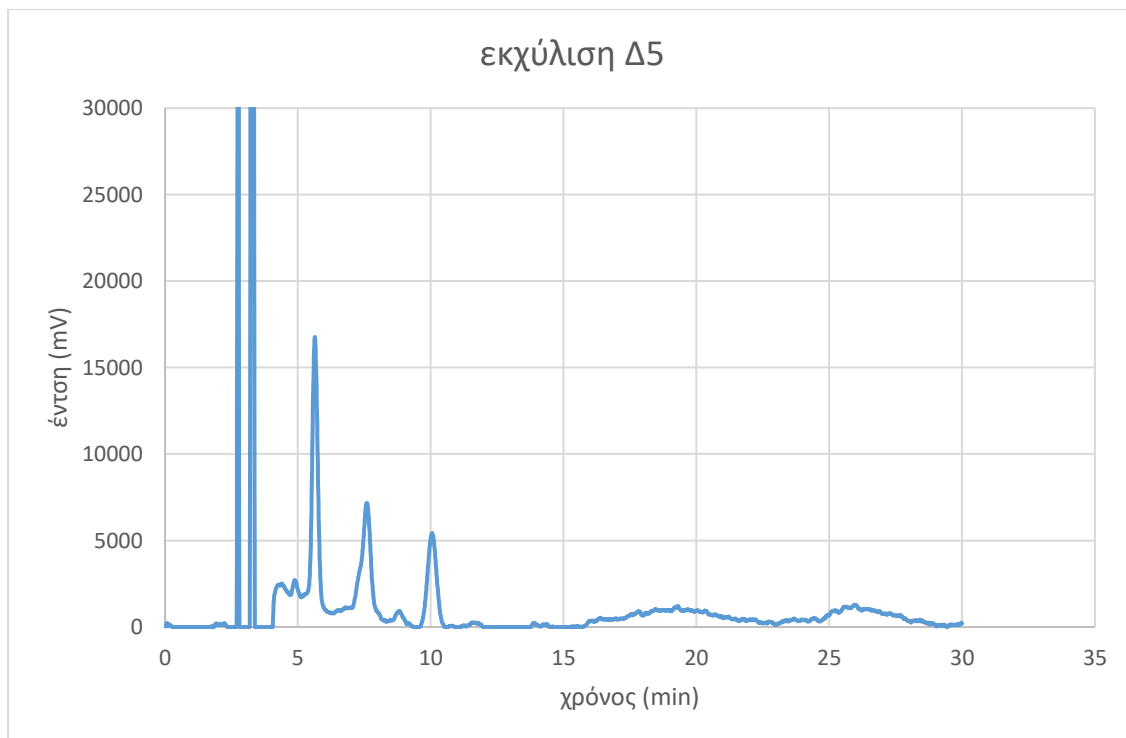
Διάγραμμα 29: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ2



Διάγραμμα 30: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ3

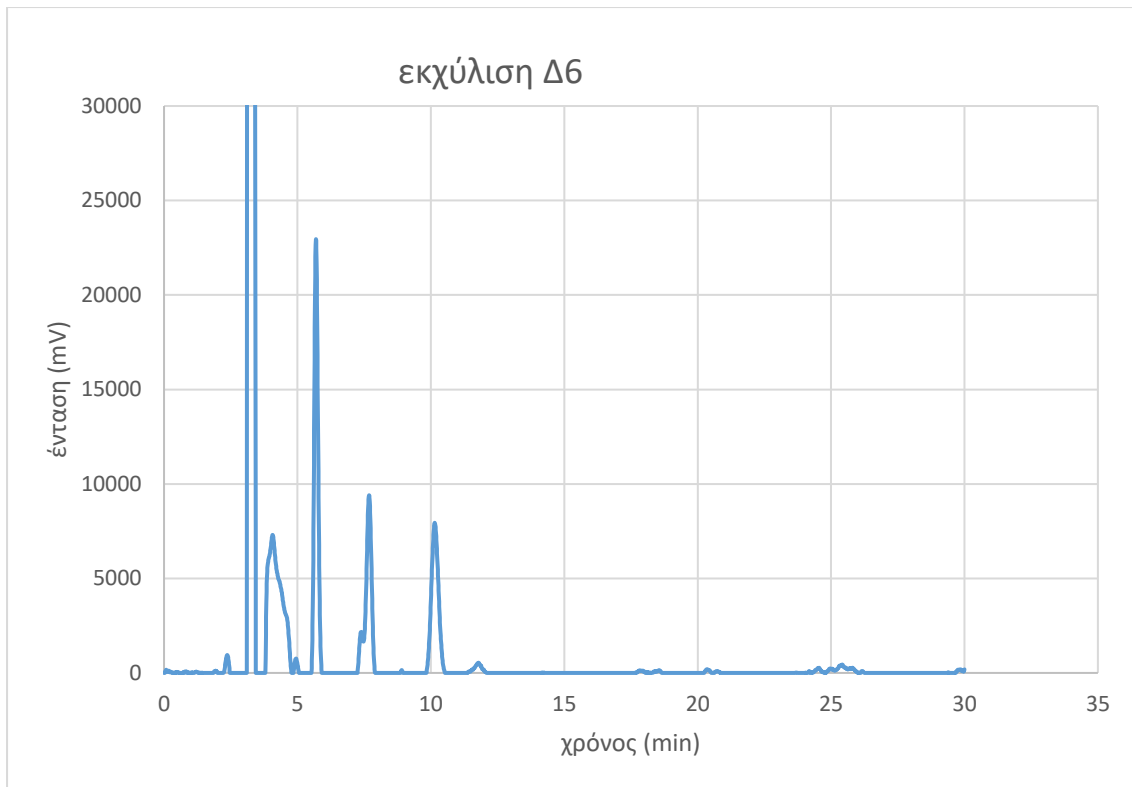


Διάγραμμα 31: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ4



Διάγραμμα 32: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ5

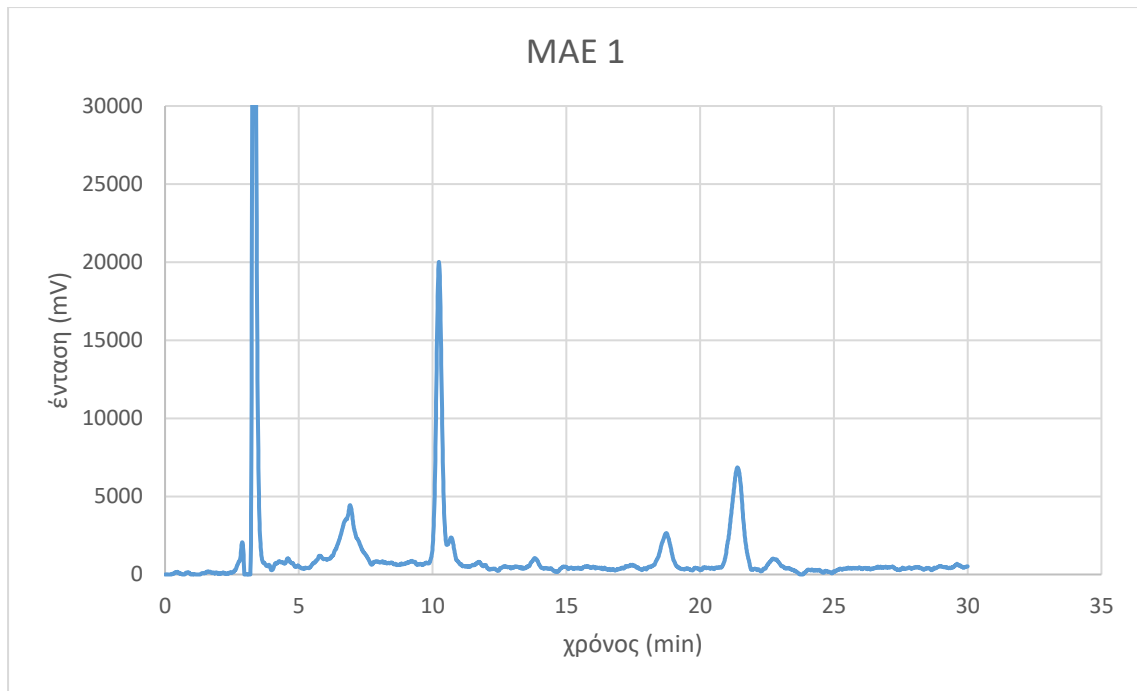




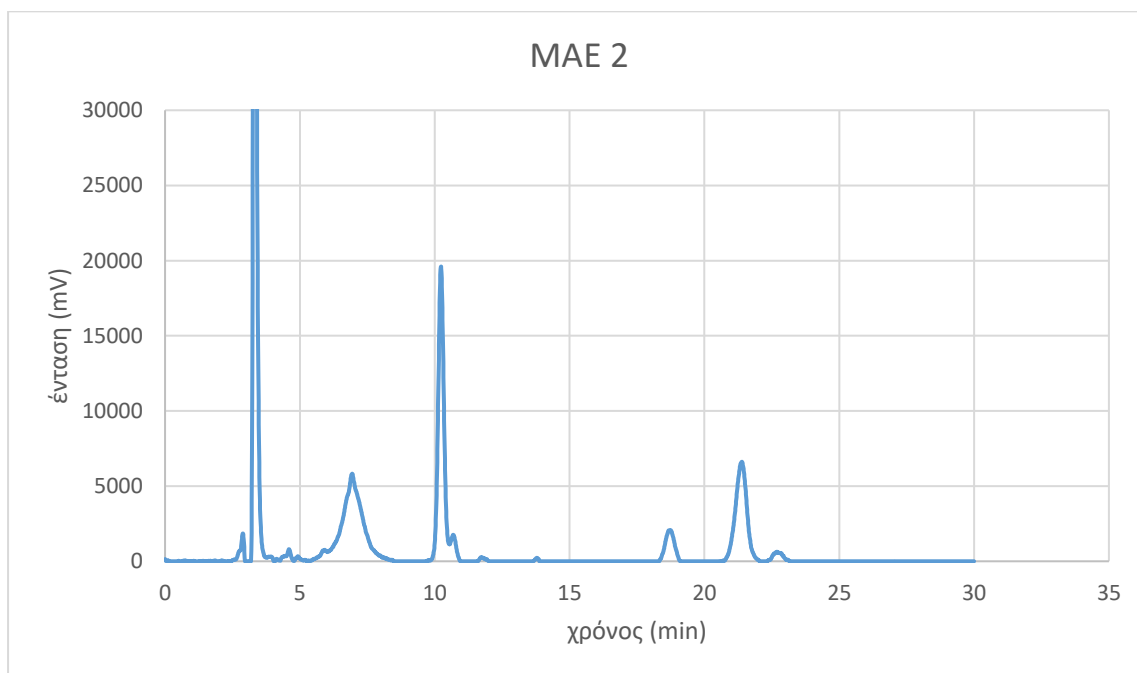
Διάγραμμα 33: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης αιθανόλης νερού 75:25 Δ6

Γίνεται αντιληπτό πως η απομόνωση σταχυόζης έγινε δυνατή σε καθαρό βαθμό για τις εκχυλίσεις Δ3, Δ4, Δ5 και Δ6. Επίσης, συναντάται σε όλες τις περιπτώσεις η σουκρόζη και ένα επιπλέον σάκχαρο σε χρόνο έκλουσης 7.7 λεπτών, το οποίο δεν μπορεί να αναγνωρισθεί με σιγουριά. Για τις εκχυλίσεις Δ1, Δ2 φαίνεται άλλη μια μικρή κορυφή σε χρόνο έκλουσης μετά τα 20 λεπτά που πιθανώς να συνδέεται με την σισσεριτόλη. [36]

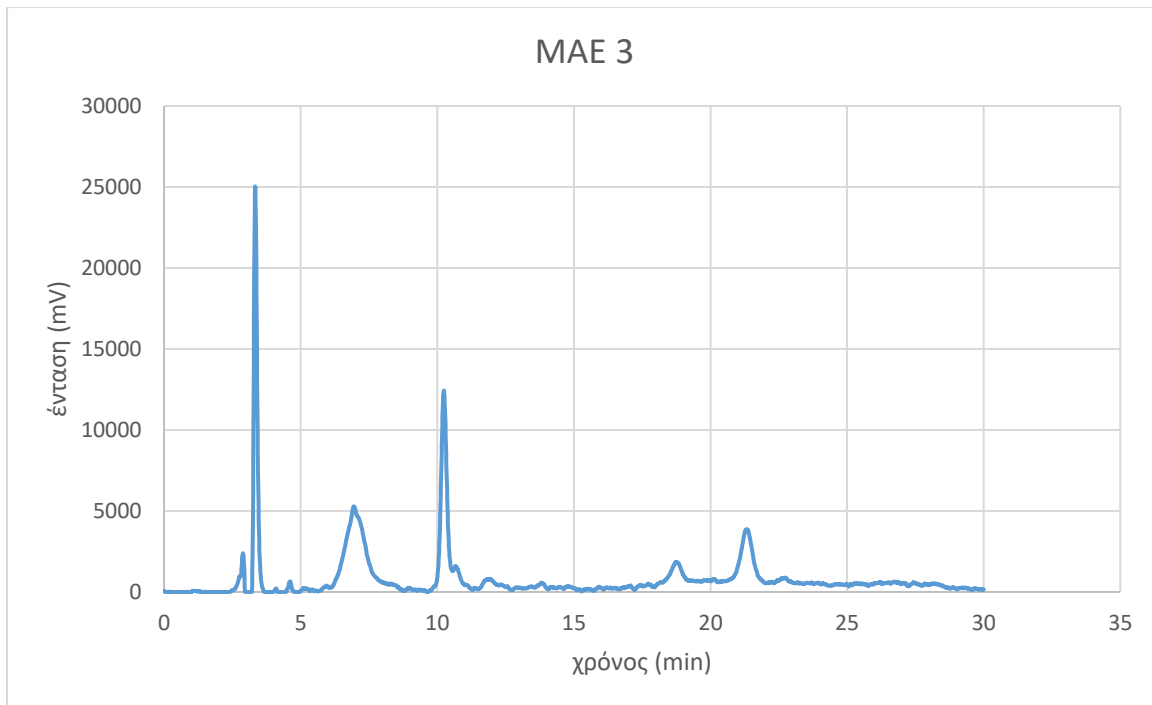
Τέλος, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα για τις εκχυλίσεις που υποβοηθούνται από μικροκυματική ακτινοβολία 250 Watt.



Διάγραμμα 34: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE1



Διάγραμμα 35: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE2



Διάγραμμα 36: χρωματογράφημα εκχυλίσματος εκχύλισης με μικροκύματα MAE2

Με την επίδραση της μικροκυματικής ακτινοβολίας φαίνεται πως και στις τρεις περιπτώσεις εκχυλίσεων γίνεται δυνατή η ανάκτηση ραφφινόζης σε αντίθεση με τις παραπάνω περιπτώσεις. Γίνεται, εμφανώς έκλυση σταχυόζης και σουκρόζης, ενώ εμφανίζεται μια επιπλέον κορυφή που σε χρόνο 21.4 λεπτών. Το σάκχαρο που πιθανώς αντιστοιχεί σε αυτήν την κορυφή είναι η σισσεριτόλη. [36]

#### 5.2.2.3 ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων

Η ποσοτική ανάλυση γίνεται αξιοποιώντας τις τιμές των εμβαδών των κορυφών των χρωματογραφημάτων κάθε εκχυλίσματος σε συνδυασμό με την αξιοποίηση των προτύπων καμπυλών για τα σάκχαρα που προμηθεύτηκαν. Τα αποτελέσματα περιεχομένου γαλακτοολιγοσακχαριτών παρουσιάζονται στους πίνακες 20, 21 και 22 για τις περιπτώσεις εκχυλισμάτων στις οποίες παρατηρήθηκε η ανάκτησή τους, δηλαδή για τις συμβατικές εκχυλίσεις στερεού υγρού που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40, και τις αντίστοιχες με μίγμα αναλογίας 75:25, μαζί με τις εκχυλίσεις στερεού υγρού που υποβοηθούνται από μικροκύματα. Παρουσιάζεται, επιπλέον σε κάθε περίπτωση ο λόγος της ποσότητας γαλακτοολιγοσακχαριτών προς την ποσότητα σουκρόζης, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της καθαρότητας του εκχυλίσματος, καθώς στόχος της εκχύλισης είναι η μέγιστη εφικτή ανάκτηση ποσότητας γαλακτοολιγοσακχαριτών με την ταυτόχρονη ελάχιστη δυνατή περιεκτικότητα σε σουκρόζη.

Στους πίνακες 20, 21 εμφανίζονται τα αποτελέσματα για το περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και συγκεκριμένα σταχυόζης σε mg ανά γραμμάριο εκχυλίσματος των εκχυλίσεων που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40 και 75:25, καθώς και του λόγου της ποσότητας σταχυόζης προς την αντίστοιχη ποσότητα σουκρόζης στο εκχύλισμα.

Πίνακας 20: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 60:40

εκχυλίσεις	Λόγος ποσοτήτων σταχυόζης προς σουκρόζη	mg σταχυόζης/ γραμμάριο εκχυλίσματος
Γ1	0.62	104.21
Γ2	0.84	138.69
Γ3	0.77	189.82
Γ4	0.96	174.45
Γ5	1.21	178.51
Γ6	1.17	218.56

Πίνακας 21: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν διαλύτη μίγμα αιθανόλης-νερού 75:25

εκχυλίσεις	Λόγος ποσοτήτων σταχυόζης προς σουκρόζη	mg σταχυόζης/ γραμμάριο εκχυλίσματος
Δ1	0.20	38.97
Δ2	0.21	43.45
Δ3	0.49	50.47
Δ4	0.81	115.92
Δ5	1.02	118.56
Δ6	0.87	130.78

Όσον αφορά τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης στερεού υγρού παρατηρείται, αρχικά, πως οι εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτες αποκλειστικά αιθανόλη ή νερό δεν επιτυγχάνουν την ανάκτηση γαλακτοολιγοσακχαριτών, τουλάχιστον σε αξιοποιήσιμες ποσότητες. Από την άλλη οι εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν ως διαλύτη μίγμα αιθανόλης νερού παρουσιάζουν δυνατότητα ανάκτησης του γαλακτοολιγοσακχαρίτη σταχυόζη. Συγκεκριμένα βελτιωμένες είναι οι τιμές για την αναλογία 60:40. Αυτό ήταν αναμενόμενο, λόγω της υψηλής πολικότητας του διαλύτη για μικρότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (έως 50%). [37]

Αρχικά, γίνεται αντιληπτό πως με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25 στους 50 °C αυξάνεται το περιεχόμενο στον γαλακτοολιγοσακχαρίτη σταχυόζη. Φαίνεται, επίσης, πως σε χρόνους 60 λεπτών παρατηρείται η μέγιστη ποσότητα απομονωμένης σταχυόζης, όμως για χρόνους 30 λεπτών οι λόγοι των ποσοτήτων σταχυόζης προς σουκρόζη στο εκχύλισμα, με εξαίρεση την περίπτωση των εκχυλίσεων Δ1, Δ2 και Δ3, είναι μεγαλύτερη, επομένως υπάρχει μια αύξηση της καθαρότητας του εκχυλίσματος. [29]

Τα καλύτερα αποτελέσματα για τις συμβατικές SLE εκχυλίσεις παρατηρήθηκαν για χρονικό διάστημα εκχύλισης 60 λεπτών, διαλύτη μίγμα αιθανόλης νερού 60:40 και θερμοκρασία 50°C.

Στον πίνακα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις εκχυλίσεις στερεού υγρού που υποβοηθούνται από μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 250 Watt στους γαλακτοολιγοσακχαρίτες σταχυόζη και ραφφινόζη εκφρασμένα ως mg ανά γραμμάριο εκχυλίσματος, καθώς και της συνολικής ποσότητας γαλακτοολιγοσακχαριτών ανά μονάδα εκχυλίσματος. Φαίνεται ,επίσης, ο λόγος της ποσότητας GOS προς την ποσότητα σουκρόζης σε κάθε εκχύλισμα. Οι εκχυλίσεις γίνονται διαλύτη μίγμα αιθανόλης νερού 60:40, εφόσον αυτή αποδείχθηκε προτιμότερη για τις συμβατικές εκχυλίσεις.

Πίνακας 22: περιεχόμενο σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες εκχυλισμάτων για εκχυλίσεις που χρησιμοποιούν την βοήθεια μικροκυμάτων

εκχυλίσεις	Λόγος συνολικής ποσότητας GOS προς την ποσότητα σουκρόζης	mg σταχυόζης/ γραμμάριο εκχυλίσματος	mg ραφφινόζης/ γραμμάριο εκχυλίσματος	mg συνολικής ποσότητας GOS/ γραμμάριο εκχυλίσματος
MAE 1	1.60	131.91	95.811	227.72
MAE 2	1.70	153.45	69.93	223.38
MAE 3	2.36	192.11	79.18	271.29

Είναι εμφανές, πως με την επίδραση των μικροκυμάτων στις εκχυλίσεις στερεού υγρού αυξάνεται η ποσότητα ανακτώμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών στο εκχύλισμα. Επιπλέον, απομονώνονται σε σχέση με τις συμβατικές εκχυλίσεις, επιπλέον, τα σάκχαρα ραφφινόζη και σισσεριτόλη, το οποίο καθιστά την διεργασία κατά πολύ αποτελεσματικότερη. Συγκεκριμένα για την σισσεριτόλη δεν είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση, καθώς η προμήθεια της πρότυπης δεν κατέστη δυνατή. Επίσης, παρατηρείται μεγαλύτερη καθαρότητα εκχυλισμάτων, εφόσον οι λόγοι της συνολικής ποσότητας μετρήσιμων GOS προς την ποσότητα σουκρόζης εμφανίζονται μεγαλύτεροι. Τέλος, με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης με μικροκύματα φαίνεται να προκύπτουν μεγαλύτερες περιεκτικότητες του εκχυλίσματος σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, αλλά και μεγαλύτερη καθαρότητα, αφού οι αντίστοιχοι λόγοι συνολικής ποσότητας GOS προς την ποσότητα σουκρόζης αυξάνονται. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα της διεργασίας με την επίδραση μικροκυμάτων δικαιολογείται και βιβλιογραφικά. [28]

## Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και μελλοντικές προτάσεις

### 6.1: Συμπεράσματα

Παρακάτω ακολουθεί μια σύνοψη των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν από την παράθεση των αποτελεσμάτων των πειραματικών μετρήσεων που προηγήθηκε στο κεφάλαιο 5. Αρχικά, όσον αφορά τις μετρήσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων στις συμβατικές εκχυλίσσεις η βέλτιστη αναλογία ποσότητας πρώτης ύλης προς τον όγκο χρησιμοποιούμενου διαλύτη είναι η 1:20, ενώ για την περίπτωση των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από υπερήχους είναι η 1:12. Παράλληλα και για τις δύο περιπτώσεις εκχυλίσεων, η μεγάλη αύξηση των εξεταζόμενων χρονικών διαστημάτων εκχύλισης δεν οδήγησε σε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου, ενώ αντίθετα είχαν αρνητική επίδραση. Τέλος, η εξεταζόμενη αύξηση της ισχύος δεν επηρέασε σημαντικά την συνολική απόδοση της ισχύος, καθώς και το συνολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, συνεπώς επιλέγεται η εφαρμογή μεσαίων επιπέδων ισχύος.

Ο συνδυασμός συμβατικής αλκαλικής εκχύλισης με την χρήση της τεχνολογίας υπερήχων απέδωσε εφόσον παρατηρήθηκαν εκχυλίσματα με υψηλότερη πρωτεϊνική περιεκτικότητα σε μικρότερους χρόνους, με τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης να σημειώνονται για ισχύ υπερήχων 450 Watt, χρονικό διάστημα εκχύλισης 10 λεπτών και αναλογίας στερεού προς διαλύτη 1:12. Επιπλέον, εφόσον η βέλτιστη αναλογία ποσότητας πρώτης ύλης προς τον όγκο χρησιμοποιούμενου διαλύτη είναι η 1:12, ενώ για τις απλές συμβατικές εκχυλίσσεις είναι η 1:20 επιτυγχάνεται ταυτόχρονα εξοικονόμηση χρησιμοποιούμενου διαλύτη και δεδομένου ότι η τεχνολογία υπερήχων εντάσσεται στις τεχνικές υψηλής ενέργειας επιτυγχάνεται μεγάλη εξοικονόμηση ενέργειας. Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν πως η υιοθέτηση της τεχνολογίας υπερήχων σε συνδυασμό με την αλκαλική εκχύλιση μπορεί να έχει πολύ θετικό αντίκτυπο όσον αφορά το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της διεργασίας, αλλά και σε επίπεδο κόστους. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν υπό την επίδραση υπερήχων παρουσίασαν, συν τοις άλλοις, βελτιωμένες φυσικές ιδιότητες και συγκεκριμένα διακύμανσης μεγέθους σωματιδίων, διαλυτότητας των πρωτεϊνών και δυνατότητας κατακράτησης ελαίου και νερού, γεγονός το οποίο τα καθιστά αξιοποιήσιμα σε μεγαλύτερο βαθμό για εφαρμογές στο πεδίο της βιομηχανίας τροφίμων.

Από την άλλη, κατά τις συμβατικές εκχυλίσσεις στερεού υγρού για την απομόνωση γαλακτοολιγοσακχαριτών με αναλογία μάζας στερεού προς όγκο χρησιμοποιούμενου διαλύτη 1:20, ο καλύτερος εξεταζόμενος διαλύτης ήταν το μίγμα αιθανόλης νερού 60:40, καθώς παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες απομονωμένης σταχυόζης σε συνδυασμό με την υψηλότερη καθαρότητα, λόγω της αύξηση των λόγων ποσότητας σταχυόζης προς την ποσότητα σουκρόζης στο εκχύλισμα. Η εξαγωγή του γαλακτοολιγοσακχαρίτη σταχυόζη έγινε δυνατή και με την χρήση ως διαλύτη μίγματος αιθανόλης νερού αναλογίας 75 προς 25, ενώ για τις εκχυλίσσεις με διαλύτη αποκλειστικά αιθανόλη ή νερό δεν παρατηρήθηκε ανάκτηση GOS. Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25 στους 50 °C επιδρά θετικά στην περιεκτικότητα σε GOS του εκχυλίσματος, καθώς και η επιλογή μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος εκχύλισης.

Επιπλέον, έγινε δοκιμή εκχύλισης στερεού υγρού σε συνδυασμό με την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας 250 Watt, με αναλογία μάζας στερεού προς όγκο χρησιμοποιούμενου διαλύτη 1:20 και για τις βέλτιστες παραμέτρους των εξεταζόμενων συμβατικών εκχυλίσεων. Η εφαρμογή της τεχνικής υψηλής ενέργειας μικροκυμάτων παρουσιάζει θετική επίδραση σε συνδυασμό με την συμβατική εκχύλιση στερεού υγρού για την απομόνωση γαλακτοολιγοσακχαριτών, τόσο σε ποιοτικό επίπεδο, αφού παρατηρείται απομόνωση τριών τύπων GOS, όσο και σε ποσοτικό, αφού οι περιεκτικότητες των εκχυλισμάτων σε GOS είναι αυξημένες και με ταυτόχρονη βελτιωμένη καθαρότητα με την αύξηση των λόγων

ποσότητας απομονωμένων GOS προς την ποσότητα σουκρόζης στο εκχύλισμα. Στον μεγαλύτερο εξεταζόμενο χρόνο εκχύλισης με μικροκύματα (20 λεπτά), εμφανίζονται τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο σε ποσοτικό επίπεδο ανάκτησης γαλακτοολιγοσακχαριτών, όσο και στην καθαρότητα του εκχυλίσματος σε περιεχόμενο GOS προς σουκρόζη. Η εξοικονόμηση χρόνου και ενέργειας καθιστά την διεργασία περισσότερο ελκυστική, ώστε να προχωρήσει ίσως σε εφαρμογές μεγαλύτερης κλίμακας.

## 6.2 Μελλοντικές προτάσεις

Είναι σημαντικό να αξιοποιηθούν όλο και περισσότερα όσπρια για την απομόνωση πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης και άλλων βιοδραστικών συστατικών, ώστε να αξιοποιηθούν για τον εμπλουτισμό προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, κάτι που θα συμβάλλει στην σταδιακή υποκατάσταση του κρέατος και των ζωικών προϊόντων στην διατροφή του ανθρώπου. Επιπλέον, αξίζει να μελετηθούν ακόμα περισσότερες μη συμβατικές τεχνικές, με γνώμονα την δυνατότητα κλιμάκωσης των διεργασιών και την ελαχιστοποίηση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των τελικών προϊόντων για την απομόνωση πρωτεϊνών και άλλων βιοδραστικών συστατικών από όσπρια, αλλά και εναλλακτικοί διαλύτες όπως για παράδειγμα οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, οι οποίοι είναι φιλικότεροι προς το περιβάλλον. Με τα παραπάνω, η αξιοποίηση των οσπρίων από την βιομηχανία τροφίμων θα εξελιχθεί μέσα από αποτελεσματικότερες, φθηνότερες, ασφαλέστερες και φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες.

Όσον αφορά το ρεβίθι προτείνεται, επιπλέον, η μελέτη απομόνωσης διαλυτών και αδιάλυτων φυτικών, αλλά και ανθεκτικού αμύλου, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τις λειτουργικές ιδιότητες που προσδίδουν κατά την προσθήκη τους σε τρόφιμα και για την ανθρώπινη υγεία. Τέλος, συστήνεται εκτενέστερη μελλοντική διερεύνηση τεχνικών απομόνωσης του γαλακτοολιγοσακχαρίτη σισσεριτόλη σε μεγάλη καθαρότητα.

## Κεφάλαιο 7: Βιβλιογραφία

- [1. Rabès, A., Seconda, L., Langevin, B., Allès, B., Touvier, M., Hercberg, S., Lairon, D., Baudry, J., Pointereau, P. and Kesse-Guyot, E. \(2020\). Greenhouse gas emissions, energy demand and land use associated with omnivorous, pesco-vegetarian, vegetarian, and vegan diets accounting for farming practices. \*Sustainable Production and Consumption\*, \[online\] 22, pp.138–146.](#)
- [2. Mogensen, L., Heusale, H., Sinkko, T., Poutanen, K., Sözer, N., Hermansen, J.E. and Knudsen, M.T. \(2020\). Potential to reduce GHG emissions and land use by substituting animal-based proteins by foods containing oat protein concentrate. \*Journal of Cleaner Production\*, \[online\] 274, p.122914.](#)
- [3. Ferreira, J.P., Sharma, A. and Zannad, F. \(2021\). The Future of Meat: Health Impact Assessment with Randomized Evidence. \*The American Journal of Medicine\*, \[online\] 134\(5\), pp.569–575.](#)
- [4. Guyatt, G.H., Oxman, A.D., Vist, G.E., Kunz, R., Falck-Ytter, Y., Alonso-Coello, P. and Schünemann, H.J. \(2008\). GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. \*BMJ\*, \[online\] 336\(7650\), pp.924–926.](#)
- [5. Guasch-Ferré, M., Satija, A., Blondin, S.A., Janiszewski, M., Emlen, E., O’Connor, L.E., Campbell, W.W., Hu, F.B., Willett, W.C. and Stampfer, M.J. \(2019\). Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials of Red Meat Consumption in Comparison With Various Comparison Diets on Cardiovascular Risk Factors. \*Circulation\*, \[online\] 139\(15\), pp.1828–1845.](#)
- [6. Van Loo, E.J., Caputo, V. and Lusk, J.L. \(2020\). Consumer preferences for farm-raised meat, lab-grown meat, and plant-based meat alternatives: Does information or brand matter? \*Food Policy\*, \[online\] 95, p.101931.](#)
- [7. Cohen, M. \(2019\). What Is the Beyond Burger and Is It Healthier Than a Regular Hamburger? \[online\] \*Good Housekeeping\*.](#)
- [8. Impossible Foods. \(2016\). What are the nutrition facts for Impossible™ Burger? \[online\]](#)
- [9. Kubala, J. \(2020\). What Is the Impossible Burger, and Is It Healthy? \[online\] \*Healthline\*.](#)
- [10. Semba, R.D., Ramsing, R., Rahman, N., Kraemer, K. and Bloem, M.W. \(2021\). Legumes as a sustainable source of protein in human diets. \*Global Food Security\*, \[online\] 28, p.100520.](#)
- [11. Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L.J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J.A., De Vries, W., Majele Sibanda, L. and Afshin, A. \(2019\). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. \*The Lancet\*, \[online\] 393\(10170\), pp.447–492.](#)
- [12. Foyer, C.H., Lam, H.-M., Nguyen, H.T., Siddique, K.H.M., Varshney, R.K., Colmer, T.D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T.A., Hodgson, J.M., Cooper, J.W., Miller, A.J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J.A., Wahlqvist, M.L., Liang, Y., Shou, H. and Shi, K. \(2016\). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. \*Nature Plants\*, \[online\] 2\(8\).](#)



13. [Mitran, T., Meena, R.S., Lal, R., Layek, J., Kumar, S. and Datta, R. \(2018\). Role of Soil Phosphorus on Legume Production. Legumes for Soil Health and Sustainable Management, \[online\] pp.487–510.](#)
14. [Tang, X., Zhang, C., Yu, Y., Shen, J., van der Werf, W. and Zhang, F. \(2020\). Intercropping legumes and cereals increases phosphorus use efficiency; a meta-analysis. Plant and Soil, \[online\] 460\(1-2\), pp.89–104.](#)
15. [Kaur, R. and Prasad, K. \(2021\). Technological, processing and nutritional aspects of chickpea \(\*Cicer arietinum\*\) - A review. Trends in Food Science & Technology, \[online\] 109, pp.448–463.](#)
16. [Europe PMC \(2016\). Europe PMC. \[online\] Europepmc.org.](#)
17. [Slavin, J. \(2013\). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. Nutrients, \[online\] 5\(4\), pp.1417–1435.](#)
18. [Fares, C. and Menga, V. \(2014\). Chickpea \(\*Cicer arietinum\* L.\) Fortification of Cereal-Based Foods to Increase Fiber and Phytochemical Content. Wheat and Rice in Disease Prevention and Health, \[online\] pp.533–546.](#)
19. [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, \[online\] 115, p.106595.](#)
20. [Pojić, M., Mišan, A. and Tiwari, B. \(2018\). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. Trends in Food Science & Technology, \[online\] 75, pp.93–104.](#)
21. [Görgüç, A., Bircan, C. and Yılmaz, F.M. \(2019\). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. Food Chemistry, \[online\] 283, pp.637–645.](#)
22. [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, \[online\] 34, pp.540–560.](#)
23. [Mena-García, A., Ruiz-Matute, A.I., Soria, A.C. and Sanz, M.L. \(2019\). Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. TrAC Trends in Analytical Chemistry, \[online\] 119, p.115612.](#)
24. [Aydemir, L.Y. and Yemenicioğlu, A. \(2013\). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. LWT - Food Science and Technology, \[online\] 50\(2\), pp.686–694.](#)
25. [Wang, F., Zhang, Y., Xu, L. and Ma, H. \(2020\). An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. LWT, \[online\] 127, p.109348.](#)
26. [el.buy-com.pp.ua \(2021\). Ισοηλεκτρικό σημείο - βιοχημεία Info. About. What's. \[online\] el.buy-com.pp.ua.](#)

27. [Scopus.com. \(2017\). Scopus - Document details - Functional and Electrophoretic Characteristics of Succinylated Peanut Flour Protein](#)
28. [Carrero-Carralero, C., Mansukhani, D., Ruiz-Matute, A.I., Martínez-Castro, I., Ramos, L. and Sanz, M.L. \(2018\). Extraction and characterization of low molecular weight bioactive carbohydrates from mung bean \(\*Vigna radiata\*\). Food Chemistry, \[online\] 266, pp.146–154.](#)
29. [Xiaoli, X., Liyi, Y., Shuang, H., Wei, L., Yi, S., Hao, M., Jusong, Z. and Xiaoxiong, Z. \(2008\). Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea \(\*Cicer arietinum\* L\) seeds by high performance liquid chromatography. Food Chemistry, \[online\] 111\(1\), pp.215–219.](#)
30. [ACS Sustainable Chemistry & Engineering. \(2019\). Conformational Changes of Soy Proteins under High-Intensity Ultrasound and High-Speed Shearing Treatments.](#)
31. [Aletor, O., Oshodi, A.A. and Ipinmoroti, K. \(2002\). Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. Food Chemistry, \[online\] 78\(1\), pp.63–68.](#)
32. [Resendiz-Vazquez, J.A., Ulloa, J.A., Urías-Silvas, J.E., Bautista-Rosales, P.U., Ramírez-Ramírez, J.C., Rosas-Ulloa, P. and González-Torres, L. \(2017\). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit \(\*Artocarpus heterophyllus\*\) seed protein isolate. Ultrasonics Sonochemistry, \[online\] 37, pp.436–444.](#)
33. [Δομή νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών \(μέρος 2 ο \) Background information.... \(n.d.\). \[online\]](#)
34. [Καθαρισμός πρωτεϊνών - Προετοιμασία δείγματος. \(n.d.\). \[online\]](#) .
35. [Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C.Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X. and Pan, S. \(2013\). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate \(SPI\) dispersions. Food Hydrocolloids, \[online\] 30\(2\), pp.647–655.](#)
36. [Zhang, Y., Su, D., He, J., Dai, Z., Asad, R., Ou, S. and Zeng, X. \(2017\). Effects of ciceritol from chickpeas on human colonic microflora and the production of short chain fatty acids by in vitro fermentation. LWT - Food Science and Technology, \[online\] 79, pp.294–299.](#)
37. [ABU-GHANNAM, N. and McKENNA, B. \(1997\). Hydration Kinetics of Red Kidney Beans \(\*Phaseolus vulgaris\* L.\). Journal of Food Science, \[online\] 62\(3\), pp.520–523.](#)



