



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΚΡΑΜΒΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΝΑ ΜΑΡΙΑ ΓΟΥΔΟΥΣΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΤΖΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας του Ε.Μ.Π. Κωνσταντίνας Τζιά.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Τζιά για την ανάθεση της εργασίας, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ Βιργινία Γιάννου, αλλά και όλο το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για τη συνεργασία και την επίλυση όλων των αποριών μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Διομή Μαμμά και το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. για τη βοήθεια σε μέρος της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία «ΣΟΓΙΑ ΕΛΛΑΣ Α.Ε.» για την προμήθεια της πρώτης ύλης.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2022

Έλενα Μαρία Γουδουσάκη

Περιεχόμενα

Πρόλογος	1
Περίληψη	5
Abstract	8
Εισαγωγή	11
Κεφάλαιο 1 Πρωτεΐνες.....	12
1.1 Αμινοξέα και Δομή πρωτεϊνών.....	12
1.2 Μετουσίωση πρωτεϊνών	15
1.3 Λειτουργικές ιδιότητες πρωτεϊνών	17
1.3.1 Διαλυτότητα.....	18
1.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού.....	21
1.3.3 Ικανότητα απορρόφησης ελαίου.....	21
1.3.4 Γαλακτωματοποιητική ιδιότητα.....	22
1.3.5 Αφριστική ιδιότητα.....	22
1.3.6 Σχηματισμός πηκτής	23
1.4 Θρεπτική αξία των πρωτεϊνών.....	24
1.5 Πηγές πρωτεϊνών	29
Κεφάλαιο 2 Τεχνολογία παραγωγής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων.....	32
2.1 Πρωτεϊνικά προϊόντα	32
2.2 Διαδικασία εκχύλισης πρωτεϊνών και παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων.....	35
2.3 Νέες τεχνολογίες-μέθοδοι εκχύλισης.....	37
2.3.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave assisted extraction, MAE)	39
2.3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (Enzyme assisted extraction, EAE)	46
2.3.3 Εκχύλιση με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DES)	52

2.3.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους (Ultrasound assisted extraction, UAE)	56
2.3.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed electric field, PEF)	63
2.3.6 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης (High voltage electrical discharge, HVED)	66
Κεφάλαιο 3 Ελαιοκράμβη.....	70
3.1 Καλλιέργεια ελαιοκράμβης.....	70
3.2 Σύσταση σπόρων ελαιοκράμβης.....	71
3.3 Βιομηχανική επεξεργασία ελαιοκράμβης	75
3.4 Πρωτεϊνική πίτα ελαιοκράμβης (παραπροϊόν).....	78
Κεφάλαιο 4 Πειραματικό Μέρος	82
4.1 Σκοπός	82
4.2 Πρώτες ύλες και Αντιδραστήρια	82
4.3 Συσκευές και Όργανα	83
4.4 Πειραματική διαδικασία	84
4.4.1 Προκατεργασία αλεύρου	84
4.4.2 Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων	86
4.5 Αναλύσεις- Μετρήσεις.....	88
4.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας.....	88
4.5.2 Προσδιορισμός ελαίου.....	88
4.5.3 Προσδιορισμός αζώτου (πρωτεϊνών)- Μέθοδος Kjeldahl	89
4.5.4 Προσδιορισμός αποδόσεων	91
4.5.5 Μέτρηση λειτουργικών ιδιοτήτων	92
4.6 Σχεδιασμός πειραμάτων-Στατιστική επεξεργασία.....	92
Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα- Συζήτηση αποτελεσμάτων	95
5.1 Σύσταση πρώτης ύλης.....	95
5.2 Προσδιορισμός ισηλεκτρικού σημείου (pI).....	95

5.3 Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης	96
5.3.1 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική υδατική μέθοδο εκχύλισης	97
5.3.2 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική υδατική μέθοδο εκχύλισης χρησιμοποιώντας απειλωμένο πρωτεϊνικό άλευρο	102
5.3.3 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης χρησιμοποιώντας ευτηκτικό διαλύτη	105
5.3.4 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα	106
5.3.5 Αποτελέσματα εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο	118
5.3.6 Αποτελέσματα εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ενζυμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο	124
Συμπεράσματα-Προτάσεις	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	136
Παράρτημα	142

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η εκχύλιση πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη για παραγωγή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων μέσω της συμβατικής, αλλά και νέων μεθόδων εκχύλισης. Τέτοιες μέθοδοι εκχύλισης είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα και η εκχύλιση με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Πρώτη ύλη για την εκχύλιση αποτελεί το βιομηχανικά απελαιωμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης που έχει παραχθεί ως παραπροϊόν της διεργασίας εκχύλισης κραιμβέλαιου από ελαιοκράμβη. Το πρωτεϊνικό άλευρο έχει περιεκτικότητα σε έλαιο ίση με 3,25% (ξ.β.), περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ίση με 39,47% (ξ.β.) και περιεκτικότητα σε υγρασία ίση με 9,98%. Η υψηλή περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες το καθιστά ικανοποιητική πηγή πρωτεϊνών, οι οποίες παραλαμβάνονται μέσω των σταδίων της εκχύλισης και της καταβύθισης.

Πριν από το στάδιο της εκχύλισης, πραγματοποιείται άλεση του πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης σε διάμετρο σωματιδίων ίση με 0,05 mm. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αρχικά μέσω της συμβατικής εκχύλισης. Ειδικότερα, ορισμένη ποσότητα πρώτης ύλης μαζί με απιονισμένο νερό ως διαλύτης φέρονται σε ποτήρι ζέσεως που τοποθετείται σε υδατόλουτρο. Η θερμοκρασία, το pH και η ανάδευση διατηρούνται σταθερά κατά την εκχύλιση των πρωτεϊνών η οποία λαμβάνει τέλος μετά το πέρας 30 min. Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών ακολουθεί η καταβύθισή τους στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, το οποίο βρίσκεται πειραματικά ίσο με 4,25. Οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες ξηραίνονται υπό κατάψυξη και αποτελούν το τελικό πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών γίνεται με τη μέθοδο Kjeldahl. Εκτός από τη συμβατική εκχύλιση, η κύρια μέθοδος εκχύλισης των πρωτεϊνών που μελετάται είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα, το ποτήρι ζέσεως που περιέχει την πρώτη ύλη και το νερό τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, αντί για συμβατικό υδατόλουτρο.

Μέσω πειραματικού σχεδιασμού, έγινε βελτιστοποίηση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών, της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών, της ολικής απόδοσης της διεργασίας και του πρωτεϊνικού περιεχομένου των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων για κάθε μέθοδο εκχύλισης, μέσω της εξέτασης ορισμένων συνθηκών εκχύλισης. Στη συμβατική εκχύλιση εξετάζεται το pH εκχύλισης (8,0, 9,0), η θερμοκρασία εκχύλισης (40, 50 °C) και ο λόγος στερεού/υγρό (1/15, 1/20, 1/25 g/mL), ενώ ο χρόνος εκχύλισης είναι σταθερός 30 min. Στην εκχύλιση με μικροκύματα εξετάζεται ο χρόνος εκχύλισης (2, 5, 8, 10 min), η ισχύς των μικροκυμάτων (240, 400 W) και ο λόγος στερεού/υγρό (1/20, 1/25 g/mL), ενώ η τιμή του pH διατηρείται ίση με 8,0.

Κατά τη συμβατική εκχύλιση, οι μέγιστες τιμές απόδοσης εκχύλισης, απόδοσης καταβύθισης, ολικής απόδοσης και πρωτεϊνικού περιεχομένου του υπερσυμπυκνώματος είναι ίσες με 29,76%, 31,41%, 9,35% και 86,10%, αντίστοιχα.

Βρέθηκε ότι το pH και η θερμοκρασία εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών, ενώ το pH εκχύλισης επηρεάζει σημαντικά και την ολική απόδοση της διεργασίας. Οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκε να είναι pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, όπου επιτυγχάνουν απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση και πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος ίσα με 29,76%, 31,41%, 9,35% και 83,50%, αντίστοιχα. Σε αυτές τις συνθήκες, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα είναι 433 g νερού/100 g δείγματος και 640 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων μέσω συμβατικής εκχύλισης εργαστηριακά απελαιωμένου πρωτεϊνικού αλεύρου σε συνθήκες εκχύλισης pH 8,0 και 9,0, θερμοκρασία 50 °C και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL. Βρέθηκε ότι το στάδιο της απελαίωσης δεν επηρεάζει σημαντικά καμία από τις αποκρίσεις.

Επιπλέον, μελετήθηκε η χρήση ευτηκτικού διαλύτη <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> κατά τη συμβατική εκχύλιση. Με θερμοκρασία εκχύλισης 50 °C και λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL επιτεύχθηκε απόδοση εκχύλισης ίση με 39,55%, υψηλότερη σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Όμως, δεν ήταν δυνατή η καταβύθιση των πρωτεϊνών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, λόγω του υψηλού ιξώδους του ευτηκτικού διαλύτη.

Κατά την νέα μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα, οι μέγιστες τιμές απόδοσης εκχύλισης, απόδοσης καταβύθισης, ολικής απόδοσης και πρωτεϊνικού περιεχομένου του υπερσυμπυκνώματος είναι ίσες με 34,57%, 30,96%, 7,35% και 87,68%, αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζει σημαντικά την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος 10 min φέρει τη μέγιστη απόδοση εκχύλισης, διαφέροντας σημαντικά από τον χρόνο 2 min. Οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκε να είναι χρόνος εκχύλισης 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, όπου επιτυγχάνουν απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση και πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος ίσα με 34,57%, 21,26%, 7,35% και 71,44%, αντίστοιχα. Σε αυτές τις συνθήκες, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα είναι 460 g νερού/100 g δείγματος και 773 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα. Όσον αφορά τη σύγκριση συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα επιτυγχάνει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο υπερσυμπύκνωμα και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων. Όμως, η απόδοση καταβύθισης όταν εφαρμόζεται η μέθοδος της εκχύλισης με μικροκύματα είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη απόδοση καταβύθισης όταν εφαρμόζεται η συμβατική εκχύλιση.

Μελετήθηκε και η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων μέσω εκχύλισης θερμικά προκατεργασμένου πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης. Πραγματοποιήθηκε συμβατική εκχύλιση σε συνθήκες: pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C,

λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, χρόνος 30 min και εκχύλιση με μικροκύματα σε συνθήκες: pH 8,0, χρόνος εκχύλισης 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W, λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL. Η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα για όλεω τις αποκρίσεις, πέραν της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία ή μη της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για καμία από τις αποκρίσεις.

Τέλος, μελετήθηκε το στάδιο της ενζυμικής προκατεργασίας του πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης. Κατά την ενζυμική προκατεργασία χρησιμοποιήθηκε κυτταρινάση Cellic Ctec2, ημικυτταρινάση Cellic Htec και μείγμα κυτταρινάσης Cellic Ctec2 και ημικυτταρινάσης Cellic Htec, αλλά τις υψηλότερες τιμές των αποκρίσεων έδωσε η κυτταρινάση Ctec2 και το μείγμα Ctec2 και Htec. Κατά τη συμβατική εκχύλιση με προκατεργασία με κυτταρινάση Ctec2, επιτεύχθηκε απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος, ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου αυτού ίσα με 39,49%, 14,52%, 5,73%, 60,51%, 700 g νερού/100 g δείγματος και 1.100 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα. Κατά τη συμβατική εκχύλιση με προκατεργασία με μείγμα κυτταρινάσης Ctec2 και ημικυτταρινάσης Htec, επιτεύχθηκε απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος, ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου αυτού ίσα με 41,20%, 12,11%, 4,99%, 73,81%, 600 g νερού/100 g δείγματος και 1.000 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα. Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με προκατεργασία με κυτταρινάση Ctec2, επιτεύχθηκε απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος, ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου αυτού ίσα με 36,32%, 17,56%, 6,38%, 71,59%, 500 g νερού/100 g δείγματος και 1.000 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα. Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με προκατεργασία με μείγμα κυτταρινάσης Ctec2 και ημικυτταρινάσης Htec, επιτεύχθηκε απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος, ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου αυτού ίσα με 33,60%, 13,94%, 4,68%, 60,45%, 600g νερού/100 g δείγματος και 800 mL ελαίου/100 g δείγματος, αντίστοιχα. Η προκατεργασία με ένζυμα παρέχει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων, αλλά χαμηλότερη απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων. Από την άλλη, η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για καμία από τις αποκρίσεις.

Λέξεις-Κλειδιά: εκχύλιση, μικροκύματα, πρωτεΐνες, ελαιοκράμβη, πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα, απόδοση

Abstract

In this thesis, the extraction of proteins from rapeseed is examined for the production of protein isolates through conventional and modern methods of extraction. Some modern methods of extraction are microwave-assisted extraction, enzyme-assisted extraction and extraction with deep eutectic solvents. The raw material for the extraction is the industrially defatted rapeseed protein flour, which is produced as by-product from the oil extraction of rapeseed. The protein flour has oil content equal to 3.25% (dry basis), protein content 39.47% (d.b.) and water content 9.98%. The high content of proteins makes it a healthy source of proteins, which are delivered via extraction and precipitation.

Before the stage of extraction, a stage of sieving occurs to the protein flour of rapeseed so the diameter of particles is equal to 0.05 mm. Extraction of proteins firstly occurs through conventional extraction. Specifically, a certain quantity of the raw material with distilled water as solvent is placed in a beaker which is placed in the water bath. During the 30 min of extraction of proteins, temperature, pH and agitation are preserved stable. The extraction of proteins is followed by their precipitation at their isoelectric point, which is calculated to be equal to 4.25. The precipitated proteins are freeze dried and form the final protein isolate. The determination of proteins is derived from Kjeldahl method. Apart from the conventional extraction, the other extraction method of proteins that is examined is the microwave-assisted extraction. In microwave-assisted extraction, the beaker, which contains the raw material and the distilled water, is placed at the microwave oven in place of the water bath.

Through experimental design, extraction yield of proteins, precipitation yield of proteins, total yield of the process and protein content of the protein isolates were optimized for every method of extraction, via the examination of certain extraction conditions. In the conventional extraction, the pH of extraction (8.0, 9.0), the temperature of extraction (40, 50 °C) and the solid/liquid ratio (1/15, 1/20, 1/25 g/mL) are examined, while the time of extraction is 30 min. In the microwave-assisted extraction, the time of extraction (2, 5, 8, 10 min), the power of microwaves (240, 400 W) and the solid/liquid ratio (1/20, 1/25 g/mL) are examined, while the pH is 8.0.

In the conventional extraction, the maximum value of extraction yield, precipitation yield, total yield and protein content of isolates are equal to 29.76%, 31.41%, 9.35% and 86.10%, respectively. The pH and the temperature of extraction were found to significantly affect the precipitation yield of proteins, while the pH of extraction was found to significantly affect the total yield of the process. The optimal conditions were found to be pH 9.0, temperature 50 °C and solid/liquid ratio 1/25 g/mL, which achieve extraction yield, precipitation yield, total yield and protein content of isolates equal to 29.76%, 31.41%, 9.35% and 83.50%, respectively. Under these conditions, the water holding capacity and oil holding capacity of the protein isolates are 433 g water/100 g sample and 640 mL oil/100 g sample, respectively.

Then, the production of protein isolates through conventional extraction of laboratory defatted protein flour was studied. The extraction conditions were pH 8.0 and 9.0, temperature 50 °C and solid/liquid ratio 1/25 g/mL. It was found that the stage of defatting does not significantly affect the responses.

Furthermore, the use of the eutectic solvent <<citric acid-glucose>> was examined with conventional extraction. With extraction temperature 50 °C and solid/solvent ratio 1/25 g/mL was achieved extraction yield equal to 39.55%, which is higher than the extraction yield of conventional extraction using water as solvent. But the isoelectric precipitation of the proteins was not possible, because of the high viscosity of the eutectic solvent.

In the microwave-assisted extraction, the maximum value of extraction yield, precipitation yield, total yield and protein content of isolates are equal to 34.57%, 30.96%, 7.35% and 87.68%, respectively. The time of extraction was found to significantly affect the extraction yield of proteins. Specifically, the time 10 min achieve the maximum extraction yield and significantly differs from the time 2 min. The optimal conditions were found to be extraction time 10 min, microwave power 400 W and solid/liquid ration 1/25 g/mL, which achieve extraction yield, precipitation yield, total yield and protein content of isolates equal to 34.57%, 21.26%, 7.35% and 71.44%, respectively. Under these conditions, the water holding capacity and oil holding capacity of the protein isolates are 460 g water/100 g sample and 773 mL oil/100 g sample, respectively. In comparison with the conventional extraction, the microwave-assisted extraction achieves higher extraction yield, total yield, protein content and water holding capacity and oil holding capacity of protein isolates. Nevertheless, the precipitation yield while using microwave-assisted extraction was found to be significantly lower than the precipitation yield with the conventional method.

Also, the production of protein isolates through extraction of thermal pre-processed protein flour was studied. The extraction took place with the conventional method at conditions: pH 9.0, temperature 50 °C, solid/liquid ratio 1/25 g/mL, time 30 min and with microwaves at conditions: pH 8.0, time of extraction 10 min, power of microwaves 400 W, solid/liquid ratio 1/25 g/mL. The thermal pre-processing was found to achieve better results for all the responses, except for the extraction yield of proteins. Nevertheless, the thermal pre-processing does not significantly affect the responses.

Finally, the stage of enzyme pre-processing of the protein flour of rapeseed was examined. The enzymes that were used were the cellulase Cellic Ctec2, the hemicellulase Cellic Htec and a mixture of the cellulase Cellic Ctec2 and the hemicellulase Cellic Htec. The higher values of the responses were obtained with the cellulase Ctec2 and the mixture cellulase Ctec2 and hemicellulase Htec. With conventional extraction and the use of cellulase Ctec2, extraction yield, precipitation yield, total yield, protein content of isolates, water holding capacity

and oil holding capacity of isolates were found to be equal to 39.49%, 14.52%, 5.73%, 60.51%, 700 g water/100 g sample and 1100 mL oil/100 g sample, respectively. With conventional extraction and the use of the mixture cellulase Ctec2 and hemicellulase Htec, extraction yield, precipitation yield, total yield, protein content of isolates, water holding capacity and oil holding capacity of isolates were found to be equal to 41.20%, 12.11%, 4.99%, 73.81%, 600 g water/100 g sample and 1000 mL oil/100 g sample, respectively. With microwave-assisted extraction and the use of cellulase Ctec2, extraction yield, precipitation yield, total yield, protein content of isolates, water holding capacity and oil holding capacity of isolates were found to be equal to 36.32%, 17.56%, 6.38%, 71.59%, 500 g water/100 g sample and 1000 mL oil/100 g sample, respectively. With microwave-assisted extraction and the use of the mixture cellulase Ctec2 and hemicellulase Htec, extraction yield, precipitation yield, total yield, protein content of isolates, water holding capacity and oil holding capacity of isolates were found to be equal to 33.60%, 13.94%, 4.68%, 60.45%, 600 g water/100 g sample and 800 mL oil/100 g sample, respectively. The enzyme pre-processing brings higher extraction yield of the proteins and water holding capacity and oil holding capacity of the protein isolates, but lower precipitation yield of the proteins and protein content of the protein isolates. However, the enzyme pre-processing of the raw material does not significantly affect the responses.

Keywords: extraction, microwaves, proteins, rapeseed, protein isolate, yield

Εισαγωγή

Ο ρόλος των πρωτεϊνών στη διατροφή των ανθρώπων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας. Οι πρωτεΐνες αποτελούν απαραίτητα δομικά και λειτουργικά συστατικά για τους οργανισμούς. Όσον αφορά τα τρόφιμα, οι πρωτεΐνες εκτός από το να προσδίδουν σε αυτά γεύση, χρώμα και άρωμα, προσδίδουν και διάφορες λειτουργικές ιδιότητες, όπως η γαλακτωματοποιητική ιδιότητα, η αφριστική ιδιότητα και ο σχηματισμός πηκτής.

Πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται εκθετικά. Για αυτό, πρέπει να βρεθούν φυτικές πηγές πρωτεϊνών, παρά ζωικές, οι οποίες να περιέχουν πολλές πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας. Τέτοιες φυτικές πηγές πρωτεϊνών αποτελούν και οι ελαιούχοι σπόροι. Ενδιαφέρον έχει η παραγωγή πρωτεϊνών από υπολείμματα ελαιούχων σπόρων που προκύπτουν ύστερα από την εκχύλιση του ελαίου τους. Οι ελαιούχοι σπόροι έχουν περιεχόμενο σε πρωτεΐνες που μπορεί να φτάσει μέχρι και ποσοστό 40%. Οι πρωτεϊνικές πίτες, που προκύπτουν από την εκχύλιση του ελαίου των ελαιούχων σπόρων, περιέχουν πρωτεΐνες σε ποσοστό 15-50%, οπότε είναι ιδανικές για την ανάκτηση πρωτεϊνών. Επιπλέον, αποτελούν σημαντικές πηγές πρωτεϊνών λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας των πρωτεϊνών τους.

Ένας ελαιούχος σπόρος με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες που έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές για την εκχύλιση πρωτεϊνών είναι η ελαιοκράμβη. Η ελαιοκράμβη περιέχει πολλές πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας και υψηλής θρεπτικής αξίας. Περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που χρειάζονται τα ζώα. Συγκεκριμένα, περιέχει κυστεΐνη και μεθειονίνη σε ισορροπημένη αναλογία με τη λυσίνη, που δεν συμβαίνει στις περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες. Η λυσίνη αποτελεί περιοριστικό αμινοξύ στα περισσότερα δημητριακά και ελαιούχους σπόρους, ενώ στην ελαιοκράμβη υπάρχει σε ικανοποιητική ποσότητα.

Γενικά, οι ελαιούχοι σπόροι αντιπροσωπεύουν το 25% της παγκόσμιας παραγωγής φυτικών πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η καλλιέργεια της ελαιοκράμβης είναι ίση με το 33% της συνολικής φυτικής καλλιέργειας. Το έτος 2014 η παραγωγή ελαιοκράμβης ήταν ίση με 24,3 Mt στην Ε.Ε. και 73,8 Mt παγκοσμίως.

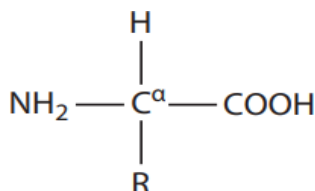
Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες-μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών, οι οποίες είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον, αλλά και πιο αποδοτικές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν και την ποιότητα και τη λειτουργικότητα των τελικών πρωτεϊνικών προϊόντων. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης δεν επαρκούν για την εκχύλιση μεγάλων και σύνθετων πολυμερικών μορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Στόχος των νέων μεθόδων εκχύλισης είναι το μεγαλύτερο ποσοστό ρήξης των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων για αύξηση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών.

Κεφάλαιο 1 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες συνιστούν απαραίτητα συστατικά για τους οργανισμούς. Έχουν σημαντικό ρόλο στη δομή και λειτουργία των κυττάρων, αφού αποτελούν δομικά συστατικά και ένζυμα που καταλύουν συγκεκριμένες βιολογικές αντιδράσεις. Επιπλέον, αποτελούν σημαντικά συστατικά των τροφίμων. Συμβάλλουν στη γεύση, το χρώμα και το άρωμα των τροφίμων, αλλά και στις φυσικές ιδιότητες των τροφίμων μέσω της ικανότητάς τους να δημιουργούν και να σταθεροποιούν πηκτές, αφρούς, γαλακτώματα και ινόμορφες δομές.

1.1 Αμινοξέα και Δομή πρωτεϊνών

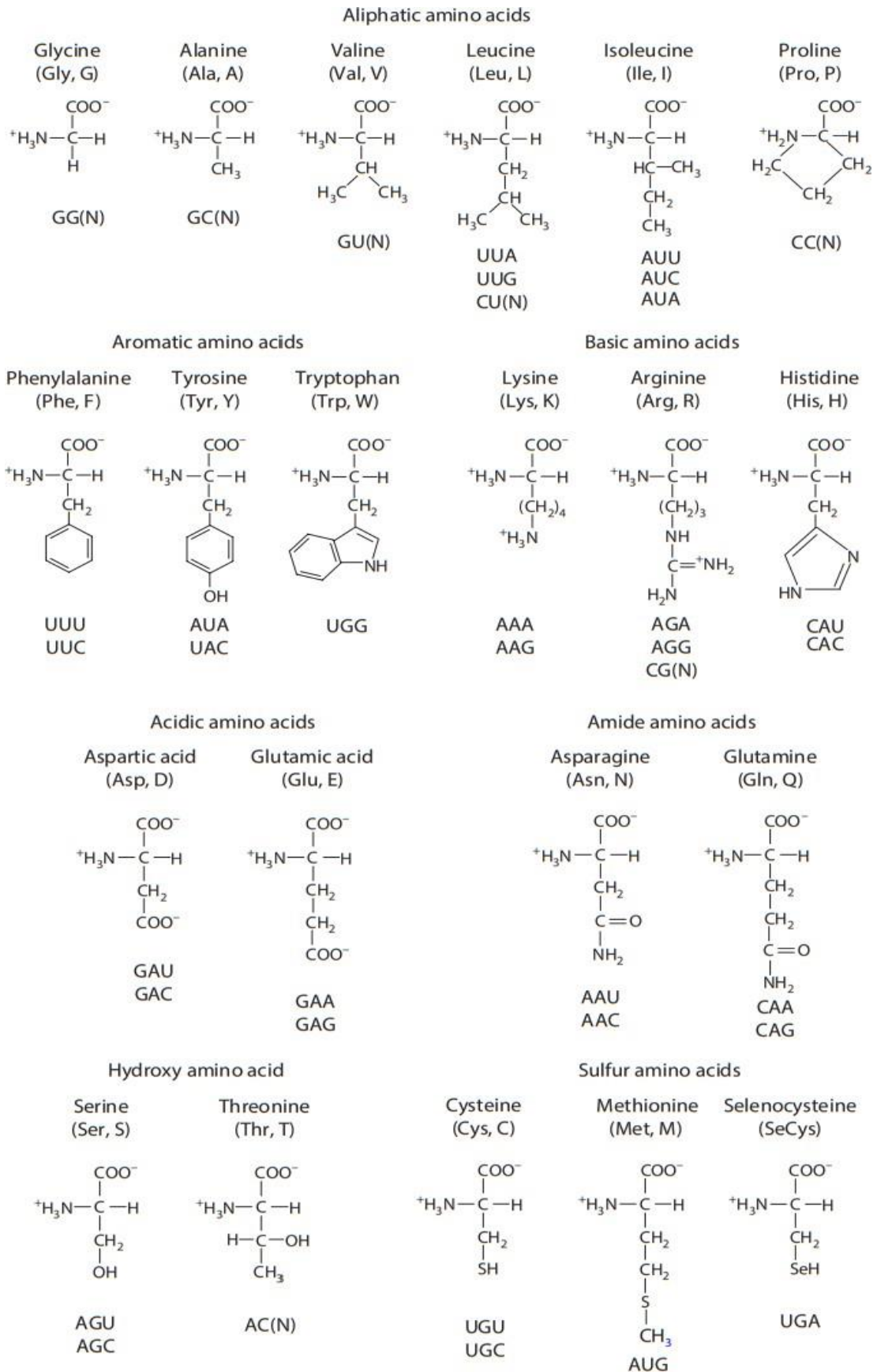
Οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκα μεγαλομόρια που αποτελούνται από 20 διαφορετικά α-L αμινοξέα. Τα αμινοξέα είναι η βασική δομική μονάδα των πρωτεϊνών και αποτελούνται από ένα α-άτομο άνθρακα που είναι ενωμένο με ένα άτομο υδρογόνου, μία αμινομάδα, μία καρβοξυλομάδα και μία πλευρική ομάδα R, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1. Γενική δομή αμινοξέων

Πηγή: Damodaran, 2017

Κατά την απλούστερη περίπτωση, η πλευρική ομάδα R ταυτίζεται με H (στο αμινοξύ γλυκίνη). Σε άλλα αμινοξέα η ομάδα R μπορεί να είναι αλειφατικό, αρωματικό ή ετεροκυκλικό τμήμα, ενώ μπορεί να ενσωματώνει και άλλες λειτουργικές ομάδες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων π.χ. φορτίο, διαλυτότητα, δυνατότητα δημιουργίας δεσμού υδρογόνου εξαρτώνται από τη φύση της ομάδας R. Τα κυριότερα α-αμινοξέα των πρωτεϊνών παρατίθενται στο σχήμα 1.2. Να σημειωθεί ότι απαραίτητα αμινοξέα αποτελούν τα αμινοξέα που πρέπει να ληφθούν από τροφές, διότι δεν συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτά τα αμινοξέα είναι τα: βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη.

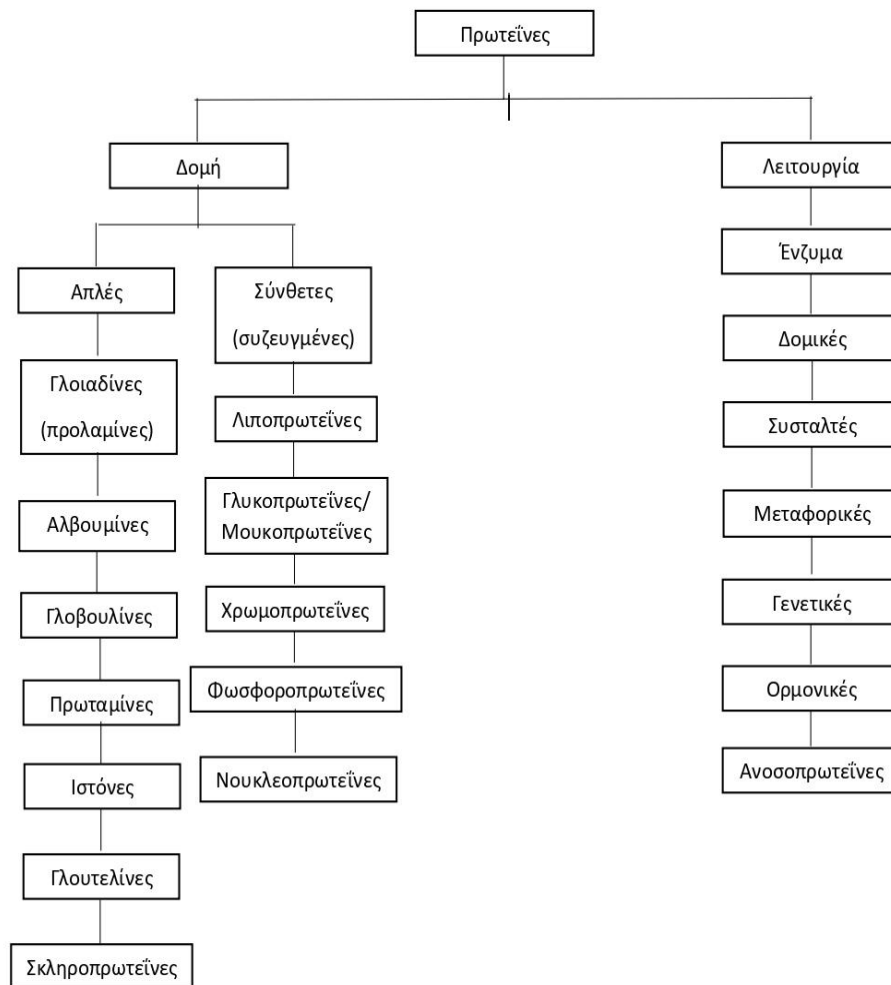


Σχήμα 1.2. Βασικά α-αμινοξέα που περιέχονται στις πρωτεΐνες

Πηγή: Damodaran, 2017

Οι περισσότερες φυσικές πρωτεΐνες συνήθως περιέχουν μέχρι 20 διαφορετικά αμινοξέα ενωμένα με αμιδικούς ή αλλιώς πεπτιδικούς δεσμούς. Τα αμινοξέα μπορούν να σχηματίσουν πολλούς συνδυασμούς πολυπεπτιδικών αλυσίδων και άρα πρωτεϊνών. Η γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεϊνικής αλυσίδας ονομάζεται πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης και καθορίζει τις ιδιότητές της. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης καθορίζει και τη μοριακή διαμόρφωση, δηλαδή τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή της. Δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης ονομάζεται η διάταξη στο χώρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γύρω από τον άξονα του αμιδικού δεσμού. Οι κυριότερες δομές δευτεροταγούς δομής είναι το β-πτυχωτό φύλλο (παράλληλο ή αντιπαράλληλο), οι ελικοειδείς δομές και ειδικότερα η α-έλικα, η τριπλή έλικα κολλαγόνου και οι αντίστροφες σπείρες. Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης αφορά την τρισδιάστατη μορφή μεγάλων τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον χώρο. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε ινόμορφες (ινώδεις) και σφαιρικές. Η τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης είναι τα σταθερότερα μοριακά συσσωματώματα που προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις περισσότερων από μίας πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Στη δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης συμβαίνουν διάφοροι δεσμοί και αλληλεπιδράσεις που προσφέρουν σταθερότητα στην πρωτεΐνη. Αυτοί είναι οι εξής: ομοιοπολικοί δεσμοί, δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις Van der Waals και δισουλφιδικοί δεσμοί

Γενικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες αναλόγως της δομής και της λειτουργίας τους, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3. Με βάση τη δομή τους, οι πρωτεΐνες ταξινομούνται σε απλές και σύνθετες. Στο μόριο των σύνθετων πρωτεϊνών υπάρχει κάποια προσθετική ομάδα π.χ. λιπίδιο, υδατάνθρακας, εκτός από την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι απλές πρωτεΐνες ταξινομούνται περαιτέρω αναλόγως της διαλυτότητάς τους σε νερό και σε όξινα, αλκαλικά ή διαλύματα αλάτων. Για παράδειγμα, οι αλβουμίνες είναι διαλυτές στο νερό (pH 6-8), οι γλοβουλίνες είναι διαλυτές σε αραιά διαλύματα αλάτων, οι γλοιαδίνες (προλαμίνες) είναι διαλυτές στην αιθανόλη 50-90° και οι γλουτελίνες είναι διαλυτές σε αραιά όξινα ή αλκαλικά διαλύματα. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Sikorski, 2007, Λιαδάκης, 1999)



Σχήμα 1.3. Ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση τη δομή και τη λειτουργία τους.

Προέλευση: Λιαδάκης, 1999 μετά από προσαρμογή

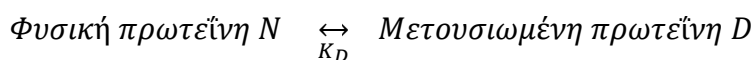
1.2 Μετουσίωση πρωτεϊνών

Η φυσική κατάσταση στην οποία βρίσκονται οι πρωτεΐνες προκύπτει από τις ελκτικές και απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων. Η φυσική κατάσταση των πρωτεϊνών είναι η θερμοδυναμικά σταθερότερη, με τη μικρότερη δυνατή ενέργεια. Κάθε αλλαγή του περιβάλλοντος, για παράδειγμα εφαρμογή ακτινοβολίας, αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος, της θερμοκρασίας και της σύστασης του διαλύτη, θα επηρεάσει τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και άρα τη φυσική κατάστασή τους. Έτσι θα προκληθούν αλλαγές στη δομή και τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, φαινόμενο που αποκαλείται μετουσίωση. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών αποτελεί αναντίστροφο φαινόμενο, αν και με εξαιρετικά ήπιες συνθήκες μπορεί να είναι αντιστρεπτό.

Οι αλλαγές που προκύπτουν κατά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών αφορούν τη δευτερογενή, τριτογενή και τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών, αλλά όχι την

πρωτοταγή, διότι δεν συμβαίνουν σχάσεις των αμιδικών δεσμών. Γενικά, μπορούν να διασπαστούν οι γέφυρες υδρογόνου, οι ιοντικοί ή οι υδρόφοβοι δεσμοί, αλλά όχι οι ομοιοπολικοί δεσμοί. Κατά τη μετουσίωση καταστρέφεται η υψηλού βαθμού τάξης διαμόρφωση των πρωτεϊνών, δίχως να συμβαίνουν χημικές αλλαγές. Οι διεδρες γωνίες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αποκτούν μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας περιστροφής και για αυτό παρατηρείται ξεδίπλωμα του πρωτεϊνικού μορίου και μετατροπή περιοχών διαμόρφωσης α-έλικας σε διαμόρφωση τυχαίας σπείρας. Αποτέλεσμα αυτού του ξεδιπλώματος είναι εμφάνιση περισσότερων ομάδων σουλφυδρυλίου (-SH) στην επιφάνεια του μορίου, οι οποίες ήταν καλυμμένες ή παρεμποδισμένες.

Θερμοδυναμικά, η μετουσίωση μπορεί να θεωρηθεί ως μία διαδικασία δύο σταδίων. Συγκεκριμένα, η ισορροπία μεταξύ της φυσικής (native) και μετουσιωμένης (denatured) πρωτεΐνης μπορεί να εκφραστεί ως εξής:



Η σταθερά ισορροπίας ταυτίζεται με τη σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης και ισούται με:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (\text{εξίσωση 1})$$

όπου [D] και [N] η συγκέντρωση της μετουσιωμένης και φυσικής πρωτεΐνης, αντίστοιχα.

Από τις συνήθειες εξισώσεις:

$$\Delta G^o = -RT \ln K \quad (\text{εξίσωση 2})$$

$$\Delta H^o = -R \left[\frac{\partial \ln K}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \right]_P \quad (\text{εξίσωση 3})$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H^o}{RT^2} \quad (\text{εξίσωση 4})$$

$$\Delta S^o = \frac{\Delta H^o - \Delta G^o}{T} \quad (\text{εξίσωση 5})$$

όπου ΔG^o , ΔH^o και ΔS^o οι μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια, την ενθαλπία και την εντροπία, αντίστοιχα.

Όπως προαναφέρθηκε, η φυσική δομή της πρωτεΐνης είναι σταθερότερη, δηλαδή βρίσκεται σε χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια, από τη μετουσιωμένη. Αυτό συμβαίνει λόγω της αύξησης της ενθαλπίας που παρατηρείται κατά τη μετουσίωση. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της εντροπίας, δηλαδή της αταξίας, που συμβαδίζει με το ξεδίπλωμα του πρωτεϊνικού μορίου. Να σημειωθεί ότι η μετουσίωση πρέπει να

θεωρείται σταδιακό φαινόμενο με πολλές ενδιάμεσες καταστάσεις, λόγω των πολλών ενδιάμεσων διαμορφώσεων του πρωτεϊνικού μορίου.

Οι παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση είναι οι εξής: αλλαγή θερμοκρασίας και αλλαγή pH, μηχανική καταπόνηση κατά την οποία αναπτύσσονται διατμητικές τάσεις, υδροστατική πίεση που προκαλεί μείωση του όγκου της πρωτεΐνης, ακτινοβολίες, απορρόφηση σε διεπιφάνειες μέσω ανάδευσης, οργανικοί διαλύτες που μεταβάλλουν τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες, υδατικά διαλύματα οργανικών ενώσεων που καταστρέφουν κυρίως τους δεσμούς υδρογόνου κλπ. Όσον αφορά την αλλαγή θερμοκρασίας, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού μετουσίωσης κατά 600 φορές για αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, οι γέφυρες υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, που είναι εξώθερμες στη φύση, αποσταθεροποιούνται, ενώ οι υδρόφοβοι δεσμοί, που είναι ενδόθερμοι, σταθεροποιούνται. Ήπια αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει μόνο την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, πιο ισχυρή αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί διάσπαση ορισμένων αμινοξέων προς θειούχες ενώσεις και αντιδράσεις μεταξύ των δραστικών ομάδων των αμινοξέων και τέλος υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί πλήρη αποσύνθεση των αμινοξέων. Μετουσίωση μπορεί να συμβεί και με τη μείωση της θερμοκρασίας, κυρίως λόγω της αποσταθεροποίησης των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που προκαλεί αύξηση της εντροπίας και επακολούθως ξεδίπλωμα του πρωτεϊνικού μορίου. Όσον αφορά το pH, οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερές σε ουδέτερες τιμές pH, αλλά μετουσιώνονται σε ακραίες όξινες ή αλκαλικές συνθήκες. Σε αυτές τις συνθήκες, παρατηρούνται ισχυρές ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των ιόντων στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών επηρεάζει τις ιδιότητές τους. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μειώνεται λόγω της αποκάλυψης υδρόφοβων ομάδων και της συσσωμάτωσης των ξεδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων. Επιπλέον, μειώνεται μερικώς ή ολικώς η ενζυμική δράση των πρωτεϊνών και μεταβάλλεται η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου. Σε κάποιες περιπτώσεις συστημάτων τροφίμων, η μετουσίωση είναι επιθυμητό φαινόμενο. Για παράδειγμα, η μερική μετουσίωση πρωτεϊνών σε διεπιφάνειες νερού-αέρα και ελαίου-αέρα βελτιώνει τις αφριστικές και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες. Κατά τη μερική θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών των λαχανικών, αυξάνεται η θρεπτική τους αξία. Επιπροσθέτως, οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες είναι πιο εύπεπτες από τις φυσικές. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Moure et al., 2006, Sathe et al., 1984, Sikorski, 2007, Λιαδάκης, 1999)

1.3 Λειτουργικές ιδιότητες πρωτεϊνών

Σημαντικό ρόλο στις προτιμήσεις των καταναλωτών παίζει η εμφάνιση, το χρώμα, η υφή, η γεύση και η οσμή των τροφίμων. Αυτές οι ιδιότητες εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις προαναφερθείσες οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών φαίνονται στον πίνακα 1.1. Η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών αναφέρεται στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες που επηρεάζουν την

απόδοση των πρωτεϊνών σε συστήματα τροφίμων κατά την επεξεργασία, αποθήκευση, παρασκευή και κατανάλωσή τους. Γενικά, η λειτουργικότητα των συστατικών των τροφίμων ορίζεται ως το σύνολο των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που επηρεάζουν τη χρησιμοποίησή τους στα τρόφιμα. Αφορά όλες τις ιδιότητες των συστατικών των τροφίμων, εκτός από τις θρεπτικές.

Πίνακας 1.1. Λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών σε συστήματα τροφίμων

Πηγή: Λιαδάκης, 1999

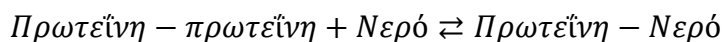
Γενική ιδιότητα	Λειτουργικά χαρακτηριστικά
Οργανοληπτική	Χρώμα, γεύση, οσμή
Κιναισθητική	Υφή, απαλότητα, στοματική αίσθηση, κοκκώδης αίσθηση, θολότητα
Ενυδάτωση	Διαλυτότητα, διαβρεκτικότητα, απορρόφηση νερού, διόγκωση, πάχυνση, ζελοποίηση, συναίρεση, ιξώδες
Επιφανειακή	Γαλακτωματοποίηση, αφρισμός, σχηματισμός μεμβράνης
Δέσμευση	Δέσμευση λιπαρών, γευστικών-οσμικών ουσιών
Δομική	Ελαστικότητα, συνεκτικότητα, καταλληλότητα για μάσηση, συνάφεια, δημιουργία πλέγματος, συσσωμάτωση, σχηματισμός ζύμης και ινών, ικανότητα αναδιαμόρφωσης και εκβολής
Ρεολογική	Ιξώδες, πήξη
Ενζυμική	Πρόσδοση τρυφερότητας, ωρίμανση
Αναμειξιμότητα	Συμπληρωματικότητα
Αντιοξειδωτική	Παρεμπόδιση ανάπτυξης δυσάρεστης γεύσης-οσμής

Εμπειρικά οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: (1) ιδιότητες ενυδάτωσης εξαρτώμενες από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-νερού, (2) επιφανειακές ιδιότητες και (3) υδροδυναμικές/ρεολογικές ιδιότητες εξαρτώμενες από το μέγεθος και το σχήμα των πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από το pH, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκρασία στο τρόφιμο.

1.3.1 Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα (solubility) ή εκχυλισιμότητα (extractability) των πρωτεϊνών ορίζεται στη χημεία τροφίμων ως το ποσοστό των συνολικών πρωτεϊνών που περιέχονται στο τρόφιμο και μπορούν να εκχυλιστούν από νερό ή από κατάλληλο διαλύτη σε ορισμένες συνθήκες. Γενικά, με τον όρο διαλυτότητα των πρωτεϊνών εννοείται η διασκορπισιμότητα (dispersibility) αυτών, διότι δεν σχηματίζουν πραγματικά διαλύματα στο νερό, αλλά κolloειδείς διασπορές. Θερμοδυναμικά, η διαλυτότητα των

πρωτεϊνών βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-διαλύτη:



Παρατηρείται μία ισορροπία μεταξύ των απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που ευνοούν τη διαλυτοποίησή τους και των ελκτικών δυνάμεων van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που ευνοούν τη συσσωμάτωσή τους. Κατά τη διαλυτοποίηση συμβαίνει διαχωρισμός των μορίων του διαλύτη, διαχωρισμός των μορίων των πρωτεϊνών και διασπορά των μορίων των πρωτεϊνών στον διαλύτη. Για αύξηση της διαλυτότητας, η πρωτεΐνη πρέπει να αλληλεπιδρά όσον το δυνατόν περισσότερο με τον διαλύτη. Αυτό συμβαίνει μέσω δεσμών υδρογόνου, δεσμών διπόλου-διπόλου και ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Γενικά, οι αδιάλυτες πρωτεΐνες δεν βρίσκουν εφαρμογές στα συστήματα τροφίμων. Να σημειωθεί ότι η διαλυτότητα είναι σημαντική και για τον λόγο πως επηρεάζει και τις άλλες λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, όπως η γαλακτωματοποιητική ιδιότητα, η αφριστική ιδιότητα και ο σχηματισμός πηκτής.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Αυτοί είναι το είδος της πρωτεΐνης και του διαλύτη, ο λόγος στερεού/διαλύτη, το pH, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία και η παρουσία οργανικών διαλυτών. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται από τον αριθμό των πολικών και μη πολικών ομάδων και από τη διευθέτησή τους κατά μήκος του μορίου. Είναι σημαντική η μελέτη της διαλυτότητας των διάφορων πρωτεϊνών για ένα μεγάλο εύρος διεργασιών, όπως η απομόνωσή τους. Όσον αφορά τους διαλύτες, οι πρωτεΐνες είναι διαλυτές μόνο σε έντονα πολικούς διαλύτες π.χ. νερό, γλυκερίνη, φορμαμίδιο, μυρμηκικό οξύ. Σε λιγότερο πολικούς διαλύτες π.χ. αιθανόλη, οι πρωτεΐνες διαλύονται σπάνια και σε μικρό βαθμό (προλαμίνες).

Όσον αφορά το pH, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα ελαχιστοποιείται για τιμή pH ίση με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών. Ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ονομάζεται η τιμή pH στην οποία οι πρωτεΐνες δεν μεταναστεύουν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στο ισοηλεκτρικό σημείο, το μόριο της πρωτεΐνης βρίσκεται υπό τη μορφή του εσωτερικού άλατος και έχει μηδενικό φορτίο. Σε κάθε μόριο, οι κατιονικές θέσεις ισούνται με τις ανιονικές σε αριθμό και δεν συμβαίνουν ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των μορίων. Επίσης, τα πρωτεϊνικά μόρια αλληλεπιδρούν ελάχιστα με το νερό. Έτσι, ενισχύεται η δημιουργία συσσωματωμάτων πρωτεϊνών και η καταβύθισή τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Αυτό το είδος καταβύθισης ονομάζεται ισοηλεκτρική καταβύθιση και αποτελεί μία βασική μέθοδο απομόνωσης πρωτεϊνών. Να σημειωθεί ότι το ισοηλεκτρικό σημείο κάθε πρωτεΐνης είναι διαφορετικό και εξαρτάται από το είδος των αμινοξέων της και τη θέση τους. Σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH από το ισοηλεκτρικό σημείο, το πρωτεϊνικό μόριο είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένο, αντίστοιχα. Τα φορτισμένα πρωτεϊνικά μόρια απωθούνται μεταξύ τους, ενισχύοντας τη διαλυτοποίηση. Επιπλέον, η διαλυτοποίηση ενισχύεται περαιτέρω από την

αλληλεπίδραση των μορίων της πρωτεΐνης με τα δίπολα του νερού. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η γραφική παράσταση της διαλυτότητας συναρτήσει του pH θα έχει τη μορφή U όπου το ελάχιστο θα αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο. Η συμπεριφορά αυτή βρίσκεται εφαρμογή ιδίως στις πρωτεΐνες των ελαιούχων σπόρων π.χ. σόγια, ηλιόσπορος, ελαιοκράμβη. Τέλος, οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερο σύνολο αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων σε $pH > pI$ (ασπαραγινικό οξύ, γουταμινικό οξύ) από ότι σύνολο θετικά φορτισμένων αμινοξέων σε $pH < pI$ (λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη). Για αυτόν τον λόγο, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη σε αλκαλικά από ότι σε όξινα pH. Επακολούθως, η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κυρίως σε αλκαλικά pH 8-9.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται και από την ιοντική ισχύ (μ) του διαλύματος, η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (\text{εξίσωση 6})$$

όπου C η συγκέντρωση και Z το σθένος του ιόντος.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται για ιόντα ουδέτερων αλάτων σε συγκεντρώσεις 0,5-1 M (εναλάτωση). Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση των φορτίων των πρωτεϊνών με τα ιόντα των αλάτων που οδηγεί στη μείωση της ηλεκτροστατικής έλξης των αντίθετα φορτισμένων πρωτεϊνικών μορίων. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μειώνεται για ιόντα ουδέτερων αλάτων σε συγκεντρώσεις >1 M (εξαλάτωση). Αυτό οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των πρωτεϊνών και των ιόντων των αλάτων για τα μόρια του νερού. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, οι πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με τον νερό και επακολούθως συσσωματώνονται και καταβυθίζονται. Η εξαλάτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Τα άλατα που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό είναι κυρίως τα: Na_2SO_4 και $(NH_4)_2SO_4$.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται και από τη θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, η διαλυτότητα αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας για εύρος θερμοκρασιών από 0 έως 40-50 °C. Εξάιρεση αποτελούν οι πολύ υδρόφωβες πρωτεΐνες π.χ. β-καζεΐνη. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες συμβαίνει μετουσίωση των πρωτεϊνών και επακολούθως συσσωμάτωση και καταβύθιση των πρωτεϊνών. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μειώνεται.

Οργανικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και η ακετόνη μειώνουν τη διηλεκτρική σταθερά του νερού και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των πρωτεϊνών. Ακολουθεί η συσσωμάτωση και καταβύθιση των πρωτεϊνών.

Γενικά, διαλυτότητα των πρωτεϊνών σχετίζεται άμεσα με τη μετουσίωσή τους. Για αυτόν τον λόγο, η διαλυτότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση του βαθμού

μετουσίωσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, της καταβύθισης και της επεξεργασίας καθαρισμού πρωτεϊνών.

1.3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού

Πολύ μεγάλο ρόλο στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών παίζει η αλληλεπίδρασή τους με το νερό και ειδικότερα η δέσμευση και ακινητοποίηση των μορίων του νερού. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-νερού και ο βαθμός ενυδάτωσης της πρωτεΐνης (g νερού ενυδάτωσης/g πρωτεΐνης) εξαρτώνται από το είδος της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα από το είδος των αμινοξέων που την αποτελούν. Γενικά, οι πρωτεΐνες είναι πολικές ουσίες και ενυδατώνονται στο νερό. Η ικανότητα ενυδάτωσης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το pH, την παρουσία αλάτων, τη θερμοκρασία και γενικά από τους παράγοντες που επηρεάζουν και τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Ειδικά για το pH, μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο εμφανίζονται ιονισμένες ομάδες στο πρωτεϊνικό μόριο, το οποίο για αυτόν τον λόγο συγκρατεί μεγάλες ποσότητες νερού. Στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, η ενυδάτωσή τους είναι η ελάχιστη.

Η ικανότητα συγκράτησης/απορρόφησης νερού (water holding capacity) είναι ένας ποσοτικός δείκτης του νερού που συγκρατείται από την πρωτεΐνη σε ορισμένες συνθήκες. Το συγκρατούμενο νερό περιλαμβάνει όλες τις μορφές νερού που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες. Η τιμή της ικανότητα συγκράτησης νερού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες προσδιορισμού της.

Η ικανότητα συγκράτησης νερού από την πρωτεΐνη μπορεί να υπολογισθεί από τον εξής εμπειρικό τύπο:

$$a = f_c + 0,4f_p + 0,2f_n \text{ (εξίσωση 7)}$$

όπου a : g δεσμευμένου νερού/g πρωτεΐνης, f_c : το κλάσμα των φορτισμένων αμινοξέων, f_p : το κλάσμα των πολικών αμινοξέων και f_n : το κλάσμα των μη πολικών/ουδέτερων αμινοξέων. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Moure et al., 2006, Sathe et al., 1984, Sikorski, 2007, Λιαδάκης, 1999)

1.3.3 Ικανότητα απορρόφησης ελαίου

Η ικανότητα απορρόφησης ελαίου (oil holding capacity) από τις πρωτεΐνες είναι πολύ σημαντική για τη γεύση και τη βελτίωση της στοματικής αίσθησης των τροφίμων. Κατά την απορρόφηση του ελαίου συμβαίνει φυσική παγίδευσή του μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-λιπαρών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι υδροφοβικής φύσης και συμβαίνουν μεταξύ των μη πολικών αλειφατικών αλυσίδων των λιπαρών με τις μη πολικές περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου. Οι αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες για πρωτεΐνες με μεγάλη υδροφοβικότητα. Επίσης, προστατεύουν τα πρωτεϊνικά μόρια από θερμική μετουσίωση λόγω της απουσίας νερού και της παρουσίας ομάδων υψηλής θερμοχωρητικότητας. Η ικανότητα απορρόφησης ελαίου εξαρτάται από τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και τη διάταξη της λιπαρής φάσης στο χώρο. (Λιαδάκης, 1999)

1.3.4 Γαλακτωματοποιητική ιδιότητα

Τα γαλακτώματα (emulsions) είναι συστήματα διασποράς ενός ή περισσότερων μη αναμειζιμων υγρών. Πολλά συστήματα τροφίμων είναι γαλακτώματα, όπως το γάλα, η κρέμα, η μαγιονέζα, ο κρόκος αυγού, το γάλα καρύδας και το γάλα σόγιας, το βούτυρο, η μαργαρίνη, προϊόντα κρέατος όπως το λουκάνικο κλπ. Αυτά τα κολλοειδή συστήματα, που είναι από τη φύση τους θερμοδυναμικά ασταθή, σταθεροποιούνται από τους γαλακτωματοποιητές, οι οποίοι είναι επιφανειακά ενεργά συστατικά που μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση αποτρέποντας τις φάσεις διασποράς να ρεύσουν μαζί. Οι πρωτεΐνες μπορούν να σταθεροποιήσουν γαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (o/w) και χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή τροφίμων.

Κατά τη δημιουργία και σταθεροποίηση γαλακτωμάτων (emulsion formation and stabilization), το πρωτεϊνικό μόριο διαχέεται προς τη διεπιφάνεια σταγονιδίου ελαίου και προσροφάται από αυτήν και ξεδιπλώνεται, μετατοπίζοντας τα μόρια νερού από τις υδρόφοβες περιοχές του οριακού στρώματος ελαίου-νερού. Έτσι, εκθέτονται υδρόφοβα τμήματα στη υδρόφοβη φάση του ελαίου ενώ διατηρούνται υδρόφιλα τμήματα στην υδατική φάση. Η ικανότητα μίας πρωτεΐνης να λειτουργήσει ως γαλακτωματοποιητής εξαρτάται από το ποσοστό προσρόφησης και από την ικανότητα ξεδιπλώματος της πρωτεΐνης. Μεγαλύτερη ικανότητα παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες που αποτελούνται από διακριτά υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα διότι προσανατολίζονται καλύτερα στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Μία πρωτεΐνη με τις ιδανικές γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες χαρακτηρίζεται από χαμηλό μοριακό βάρος, ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων (φορτισμένων, πολικών και μη πολικών φορτίων), υψηλή υδατοδιαλυτότητα, καλά ανεπτυγμένη επιφανειακή υδροφοβικότητα και σταθερή διαμόρφωση. Η β-καζεΐνη έχει μεγάλη γαλακτωματοποιητική ικανότητα λόγω των λιγότερο έντονων δευτεροταγών δομών και καμίας διασύνδεσης λόγω έλλειψης ομάδων σουλφυδρυλίου (-SH).

Το pH είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τις γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες είναι άριστες είτε στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, είτε σε pH αρκετά μακριά από αυτό. Επιπλέον, η θέρμανση ή η προσθήκη επιφανειακά ενεργών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους μειώνουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος.

1.3.5 Αφριστική ιδιότητα

Οι αφροί (foams) των τροφίμων είναι διασπορά φυσαλίδων αερίου σε συνεχή υγρή ή ημιστερεή φάση. Συνήθως, το αέριο είναι ο αέρας ή CO₂ και η συνεχής φάση είναι ένα υδατικό διάλυμα ή ένα αιώρημα πρωτεϊνών. Πολλά τρόφιμα περιέχουν αφρούς, όπως οι μαρέγκες, τα κέικς, οι μύτερες, τα παγωτά, η σαντιγί και διάφορα προϊόντα ζαχαροπλαστικής. Να σημειωθεί ότι το παγωτό είναι το πιο πολύπλοκο κολλοειδές τρόφιμο. Στο παγωτό, αλλά και σε άλλα τρόφιμα, οι φυσαλίδες έχουν σφαιρικό σχήμα. Οι φυσαλίδες, όμως, μπορούν να έχουν και πολύεδρο σχήμα, όπως στον αφρό της μπύρας. Η ομοιόμορφη κατανομή μικρών φυσαλίδων αερίου δίνει απαλή υφή και καλύτερη αίσθηση της γεύσης στο τρόφιμο. Γενικά, οι φυσαλίδες αερίου διαχωρίζονται

από λεπτά στρώματα υγρού. Για να διατηρείται η διεπιφάνεια αερίου/υγρού, απαιτούνται επιφανειακά ενεργές ουσίες που μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση. Αυτές οι ουσίες είναι κυρίως πρωτεΐνες και βοηθούν στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των αφρών (foam formation and stabilization).

Οι πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα σχηματισμού λεπτών ελαστικών μεμβρανών όταν προσροφώνται σε διεπιφάνειες αερίου/υγρού. Για αυτόν τον λόγο, οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται στη σταθεροποίηση αφρών που συμβαίνει μέσω σχηματισμού εύκαμπτων, συνεκτικών υμενίων γύρω από τις φυσαλίδες. Ο σχηματισμός αφρού και συγκεκριμένα ο σχηματισμός ελαστικών μεμβρανών γύρω από τις φυσαλίδες ακολουθεί συγκεκριμένη διαδικασία. Αρχικά, οι πρωτεΐνες διαχέονται στη διεπιφάνεια αερίου/υγρού και προσροφώνται μέσω των υδρόφοβων περιοχών, αφού συμβούν δομικές ανακατατάξεις των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι πολικές ομάδες προσανατολίζονται προς τη συνεχή υδατική φάση, ενώ αντίθετα οι μη πολικές ομάδες προσανατολίζονται προς το αέριο. Έπειτα, ακολουθεί μερικό ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζουν συνεκτικές λεπτές μεμβράνες σταθεροποίησης. Ο σχηματισμός νέων διεπιφανειών και περαιτέρω φυσαλίδων αερίου διευκολύνεται από τη μειωμένη επιφανειακή τάση που προκύπτει από την προσρόφηση των πρωτεϊνών.

Η σταθερότητα ενός αφρού εξαρτάται από την αντοχή της πρωτεϊνικής λεπτής μεμβράνης και από τη διαπερατότητά της σε αέρια. Η αντοχή της μεμβράνης εξαρτάται από την προσροφημένη ποσότητα της πρωτεΐνης και τη δυνατότητα των προσροφημένων μορίων να συνδέονται μεταξύ τους. Όσο ισχυρότερη είναι αυτή η σύνδεση, τόσο σταθερότερη η μεμβράνη. Μία πρωτεΐνη με τις ιδανικές αφριστικές ιδιότητες χαρακτηρίζεται από χαμηλό μοριακό βάρος, υψηλή επιφανειακή υδροφοβικότητα, υψηλή διαλυτότητα και ευκολία στη μετουσίωση. Όσον αφορά τη βέλτιστη τιμή pH, η σύνδεση των προσροφημένων μορίων ευνοείται όταν οι πρωτεΐνες έχουν ουδέτερο φορτίο, δηλαδή σε pH ίσο με το ισοηλεκτρικό τους σημείο.

1.3.6 Σχηματισμός πηκτής

Οι πηκτές (gels) αποτελούνται από ένα δομημένο τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα, ικανό να συγκρατήσει μεγάλες ποσότητες νερού, φυσικά παγιδευμένου. Το πλέγμα αυτό δημιουργείται λόγω συσσωμάτωσης μετουσιωμένων μορίων και χαρακτηρίζεται από έλλειψη ρευστότητας και ελαστικής παραμόρφωσης. Θα μπορούσε να πει κανείς ότι οι πηκτές κατατάσσονται μεταξύ διαλυμάτων και ιζημάτων. Ο σχηματισμός πηκτής ή αλλιώς ζελοποίηση (gel formation/gelation) είναι σημαντική ιδιότητα των πρωτεϊνών για μεγάλο εύρος τροφίμων, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα προϊόντα κρέατος και ψαριού και οι ζύμες.

Για τον σχηματισμό πηκτής πρέπει να είναι κατάλληλη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και οι συνθήκες. Ο σχηματισμός πηκτής περιλαμβάνει συνήθως δύο στάδια: θερμική κατεργασία, κατά την οποία συμβαίνει ξεδίπλωμα και μετουσίωση των πρωτεϊνικών μορίων και έπειτα ψύξη κατά την οποία συμβαίνει συσσωμάτωση των μορίων προς σχηματισμό του πλέγματος. Για να σχηματιστεί πηκτή υψηλής τάξης θα πρέπει η ψύξη

να γίνει με βραδύ ρυθμό. Αν η ψύξη πραγματοποιηθεί με γρήγορο ρυθμό, θα σχηματιστεί πήγμα (coagulum), δηλαδή τυχαίο πλέγμα που δεν μπορεί να συγκρατήσει νερό. Ο σχηματισμός πηκτής ή πλέγματος, εκτός από τον ρυθμό ψύξης, εξαρτάται από την υδροφοβικότητα και το φορτίο της πρωτεΐνης.

Οι πηκτές κατηγοριοποιούνται σε θερμοσκληρυνόμενες και θερμοπλαστικές αναλόγως της συμπεριφοράς τους κατά τη θέρμανση και ψύξη. Οι θερμοσκληρυνόμενες πηκτές (thermoset gels), π.χ. πρωτεΐνες σόγιας, πρωτεΐνες λευκώματος αυγού, σχηματίζονται με θέρμανση και δεν μπορούν να επανατακούν χωρίς καταστροφή της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνικών μορίων. Οι θερμοπλαστικές πηκτές (thermoplastic gels) με θέρμανση τήκονται και ρέουν και όταν ψυχθούν πάλι δίνουν πηκτή, δηλαδή είναι αντιστρεπτές.

Για τον σχηματισμό πηκτής υψηλής τάξης πρέπει να υπάρχει κρίσιμη ισορροπία ελκτικών και απωστικών δυνάμεων και αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-νερού. Ο σχηματισμός πηκτής ευνοείται σε τιμές pH 7-8 για τις περισσότερες πρωτεΐνες. Επιπλέον, αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, καθώς και προσθήκη άλατος, ευνοούν τον σχηματισμό πηκτής. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Moure et al., 2006, Sathe et al., 1984, Sikorski, 2007, Λιαδάκης, 1999)

1.4 Θρεπτική αξία των πρωτεϊνών

Για τη διατροφή του ανθρώπου σημαντικό ρόλο παίζει η θρεπτική αξία (nutritive value) των πρωτεϊνών, πέρα από τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Οι πρωτεΐνες της διατροφής παρέχουν άζωτο και αμινοξέα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του σώματος, αλλά και άλλων αζωτούχων ενώσεων. Όπως έχει αναφερθεί, ορισμένα αμινοξέα, τα οποία ονομάζονται απαραίτητα, πρέπει να ληφθούν από τις πρωτεΐνες της τροφής, διότι δεν συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Οι πρωτεΐνες της τροφής πέπτονται από πρωτεολυτικά ένζυμα του γαστρεντερικού συστήματος. Τα αμινοξέα που προκύπτουν από την πέψη των πρωτεϊνών απορροφώνται και οδηγούνται στο ήπαρ. Εκεί είτε συνθέτουν τις πρωτεΐνες του σώματος, φαινόμενο που ονομάζεται αναβολισμός, είτε αποικοδομούνται και αποβάλλονται. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες του σώματος καταβολίζονται προς τα επιμέρους αμινοξέα, φαινόμενο που αποκαλείται καταβολισμός. Ο καταβολισμός και αναβολισμός των πρωτεϊνών του σώματος βρίσκονται σε μία συνεχή δυναμική ισορροπία. Καθημερινά, καταβολίζεται και αναβολίζεται το 3% των πρωτεϊνών του σώματος.

Η ελάχιστη απαίτηση του ανθρώπου σε πρωτεΐνες ισούται με το ποσό των πρωτεϊνών το οποίο είναι ικανό να διατηρεί μηδενική τη διαφορά μεταξύ λήψης και αποβολής αζώτου. Η καθημερινή απαίτηση του ανθρώπου σε πρωτεΐνες εξαρτάται από το είδος και τη σύνθεση των πρωτεϊνών της διατροφής, το είδος της υπόλοιπης διατροφής, το φύλο, την ηλικία, τη φυσική κατάσταση, τον μεταβολισμό του ατόμου κλπ.

Γενικά οι πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς τη θρεπτική αξία τους. Η θρεπτική αξία/θρεπτικότητα των πρωτεϊνών αφορά την ικανότητά τους να καλύπτουν τις απαιτήσεις του ανθρώπου σε άζωτο και αμινοξέα και να εξασφαλίζουν τη σωστή ανάπτυξη και διατήρηση. Η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών εξαρτάται από τα εξής:

Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο

Οι πρωτεϊνικές ανάγκες του οργανισμού δεν καλύπτονται με τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες σε ποσοστό χαμηλότερο του 3%, ακόμα και αν η ποσότητα κατανάλωσής τους καλύπτει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Από την άλλη, τρόφιμα με ποσοστό πρωτεϊνών 8-10%, όπως τα δημητριακά, καλύπτουν τις πρωτεϊνικές ανάγκες του οργανισμού, αν η ποσότητα κατανάλωσής τους καλύπτει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού.

Ποιότητα πρωτεϊνών

Η ποιότητα μίας πρωτεΐνης αφορά το είδος και την ποσότητα των αμινοξέων που περιέχει. Υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη αποτελεί μία πρωτεΐνη που περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε επίπεδο μεγαλύτερο από ένα συγκεκριμένο επίπεδο αναφοράς και σε κατάλληλη αναλογία. Γενικά, οι ζωικές πρωτεΐνες είναι καλύτερης ποιότητας σε σχέση με τις φυτικές πρωτεΐνες. Οι φυτικές πρωτεΐνες είναι συνήθως ελλειμματικές σε απαραίτητα αμινοξέα. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες των δημητριακών και των λαχανικών είναι συνήθως ελλειμματικές σε τουλάχιστον ένα απαραίτητο αμινοξύ. Οι πρωτεΐνες των περισσότερων δημητριακών έχουν χαμηλά επίπεδα λυσίνης και υψηλά επίπεδα μεθειονίνης και οι πρωτεΐνες των περισσότερων λαχανικών και ελαιούχων σπόρων έχουν χαμηλά ποσοστά μεθειονίνης και υψηλά ή επαρκή επίπεδα λυσίνης. Τα απαραίτητα αμινοξέα μίας πρωτεΐνης που βρίσκονται σε μεγαλύτερο έλλειμμα σε σχέση με τις ανθρώπινες απαιτήσεις ονομάζονται περιοριστικά αμινοξέα. Το περιεχόμενο διάφορων τροφίμων σε απαραίτητα αμινοξέα παρουσιάζεται στον πίνακα 1.2. Η βελτίωση της ποιότητας πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί είτε με ενίσχυση μέσω προσθήκης ελεύθερων αμινοξέων, είτε με συνδυασμό δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών για επίτευξη αλληλοσυμπλήρωσης των απαραίτητων αμινοξέων, π.χ. συνδυασμός πρωτεϊνών δημητριακών και λαχανικών. Από την άλλη, υπερκατανάλωση συγκεκριμένων αμινοξέων οδηγεί σε ανταγωνισμό μεταξύ των αμινοξέων ή τοξικότητα.

Πίνακας 1.2. Περιεχόμενο σε απαραίτητα αμινοξέα και θρεπτική αξία πρωτεϊνών από διάφορες πηγές τροφίμων

Προέλευση: Damodaran, 2017 μετά από προσαρμογή

	Αυγό	Γάλα αγελάδας	Μοσχάρι	Ψάρι	Σίτος	Ρύζι	Καλα- μπόκι	Κριθάρι	Σόγια	Κουκιά βρασμένα	Μπιζέλι	Αραχίδα	Πράσινα Φασολάκια
Συγκέντρωση αμινοξέων (mg/g πρωτεΐνης)													
Ιστιδίνη	22	27	34	35	21	21	27	20	30	26	26	27	30
Ισολευκίνη	54	47	48	48	34	40	34	35	51	41	41	40	45
Λευκίνη	86	95	81	77	69	77	127	67	82	71	70	74	78
Λυσίνη	70	78	89	91	23 ^α	34 ^α	25 ^α	32 ^α	68	63	71	39 ^α	65
Μεθειονίνη+Κυστεΐνη	57	33	40	40	36	49	41	37	33	22 ^β	24 ^β	32	26
Φαινυλαλανίνη+Τυροσίνη	93	102	80	76	77	94	85	79	95	69	76	100	83
Θρεονίνη	47	44	46	46	28	34	32 ^β	29 ^β	41	33	36	29 ^β	40
Τρυπτοφάνη	17	14	12	11	10	11	6 ^β	11	14	8 ^α	9 ^α	11	11
Βαλίνη	66	64	50	61	38	54	45	46	52	46	41	48	52
Συνολικά απαραίτητα αμινοξέα	512	504	480	485	336	414	422	356	466	379	394	400	430
Περιεχόμενο σε πρωτεΐνες (%)	12	3,5	18	19	12	7,5	-	-	40	32	28	30	30
Χημική βαθμολογία ^γ(%)	100	100	100	100	40	59	43	55	100	73	82	67	-
Λόγος αποτελεσματικότητας πρωτεΐνης ^γ	3,9	3,1	3,0	3,5	1,5	2,0	-	-	2,3	-	2,65	-	-
Βιολογική αξία ^γ	94	84	74	76	65	73	-	-	73	-	-	-	-
Καθαρή χρησιμοποίηση πρωτεΐνης ^γ	94	82	67	79	40	70	-	-	61	-	-	-	-

^α Πρωτεύον Περιοριστικό Αμινοξύ

^β Δευτερεύον Περιοριστικό Αμινοξύ

Βιοδιαθεσιμότητα αμινοξέων

Μία πρωτεΐνη έχει υψηλή θρεπτική αξία όταν, εκτός από κατάλληλο είδος αμινοξέων στην κατάλληλη αναλογία, έχει και συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα με αυτήν των πρωτεϊνών του λευκώματος του αυγού ή του γάλακτος. Η βιοδιαθεσιμότητα των αμινοξέων αφορά την ικανότητά τους να απορροφώνται από τον οργανισμό, εφόσον πέπτονται οι πρωτεΐνες που τα περιέχουν. Για αυτόν τον λόγο, η βιοδιαθεσιμότητα των αμινοξέων αναφέρεται και ως πεπτικότητα των πρωτεϊνών. Οι ζωικές πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα των αμινοξέων τους, σε σχέση με τις φυτικές πρωτεΐνες. Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των αμινοξέων των πρωτεϊνών, όπως η πρωτεϊνική διαμόρφωση, οι αντιθρεπτικοί παράγοντες (π.χ. αναστολείς τρυψίνης), η παραγωγική διαδικασία (π.χ. ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH), η δέσμευση διαφόρων ουσιών (π.χ. μέταλλα, λιπίδια, πολυσακχαρίτες) από τις πρωτεΐνες ή τα αμινοξέα τους, το μέγεθος και η επιφάνεια των πρωτεϊνικών σωματιδίων και οι βιολογικές διαφορές μεταξύ των διάφορων ατόμων.

Η πεπτικότητα των πρωτεϊνών ως ποσοστό επί τοις εκατό διαφόρων τροφίμων από τον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζεται και στον πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3. Πεπτικότητα πρωτεϊνών διαφόρων τροφίμων από τον ανθρώπινο οργανισμό

Προέλευση: Damodaran, 2017 μετά από προσαρμογή

Πρωτεϊνική πηγή	Πεπτικότητα (%)	Πρωτεϊνική πηγή	Πεπτικότητα (%)
Αυγό	97	Κεχρί	79
Γάλα, τυρί	95	Μπιζέλια	88
Κρέας, ψάρι	94	Αραχίδα	94
Καλαμπόκι	85	Άλευρο σόγιας	86
Ρύζι	88	Πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα σόγιας	95
Σίτος (ολόκληρος)	86	Φασόλια	78
Άλευρο σίτου	96	Δημητριακά καλαμποκιού	70
Γλουτένη σίτου (σεϊτάν)	99	Δημητριακά σίτου	77
Βρώμη	86	Δημητριακά ρυζιού	75

Ο προσδιορισμός της θρεπτικής αξίας των πρωτεϊνών γίνεται κυρίως με βιολογικές μεθόδους, αλλά μπορεί να γίνει και με χημικές, ενζυμικές και μικροβιολογικές μεθόδους. Κατά τις βιολογικές μεθόδους, προσδιορίζεται η αύξηση του αζώτου ή του

σωματικού βάρους πειραματόζωων. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρονοβόρες, επίπονες και όχι τόσο ακριβείς. Οι κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται στις βιολογικές μεθόδους είναι οι:

(1) Βιολογική αξία (Biological Value-BV):

BV = 100 (Συγκρατούμενο άζωτο N) / (Απορροφούμενο N)

$$BV = \frac{1 - (F - F_e) - (U - U_e)}{1 - (F - F_e)} 100 \text{ (εξίσωση 8)}$$

όπου, F το άζωτο κοπράνων, U το άζωτο ούρων κατά την ημερήσια ροή πρωτεϊνών και αμινοξέων στον άνθρωπο με τον δείκτη e να αναφέρεται σε μη πρωτεϊνική διατροφή.

(2) Λόγος αποτελεσματικότητας πρωτεΐνης (Protein Efficiency Ratio-PER):

PER = (Αύξηση βάρους) / (Κατανάλωση πρωτεΐνης) (εξίσωση 9)

(3) Καθαρός λόγος πρωτεΐνης (Net Protein Ratio-NPR):

NPR = (Αύξηση βάρους + Μείωση βάρους από μη πρωτεϊνική διατροφή) / (Κατανάλωση πρωτεΐνης) (εξίσωση 10)

(4) Καθαρή χρησιμοποίηση πρωτεΐνης (Net Protein Utilization-NPU):

NPU = 100 (Συγκρατούμενο άζωτο N) / (Κατανάλωση N)

$$NPU = \frac{1 - (F - F_e) - (U - U_e)}{1} 100 \text{ (εξίσωση 11)}$$

Κατά τις χημικές μεθόδους, προσδιορίζεται η σύσταση των αμινοξέων μίας πρωτεΐνης και συγκρίνεται με τα πρότυπα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ο σημαντικότερος δείκτης στις χημικές μεθόδους είναι η Χημική βαθμολογία (Chemical Score) που ισούται με:

$$\frac{mg \text{ κύριου περιοριστικού αμινοξέος ανά } g \text{ πρωτεΐνης}}{mg \text{ του ίδιου περιοριστικού αμινοξέος ανά } g \text{ πρωτεΐνης αναφοράς}} 100$$

Γενικά, η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών μπορεί να αυξηθεί με θερμική διεργασία, διότι απομακρύνονται αντιθρεπτικοί παράγοντες και αδρανοποιούνται αναστολείς ενζύμων. Όμως, υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας μειώνουν τη θρεπτική αξία των πρωτεϊνών, ενώ μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή ορισμένων αμινοξέων, ισομερίωση προς σχηματισμό D μορφών (μη απορροφούμενων) και σχηματισμό κυκλικών ενώσεων που προκαλούν μεταλλάξεις.

Από την άλλη, έκθεση των πρωτεϊνών σε αλκαλικό περιβάλλον, π.χ. κατά την αλκαλική εκχύλιση πρωτεϊνών, μειώνει τη θρεπτική αξία τους λόγω ανεπιθύμητων μεταβολών, όπως καταστροφή ορισμένων αμινοξέων, σχηματισμός λυσινοαλανίνης που είναι

τοξική και μείωση της βιοδραστικότητας των αμινοξέων και απώλειά τους. (Damodaran, 2017, Moure et al., 2006, Λιαδάκης, 1999)

1.5 Πηγές πρωτεϊνών

Κρέας

Το κρέας αποτελεί καλή πηγή πρωτεϊνών λόγω της σύστασης των αμινοξέων του που προσομοιάζει τις απαιτήσεις των ανθρώπινων οργανισμών σε αμινοξέα. Ο όρος κρέας αναφέρεται στον σκελετικό μυϊκό ιστό των ζώων. Ο μυϊκός ιστός αποτελείται από ~70% υγρασία και 18-23% πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, οι μύες από τους οποίους έχει αφαιρεθεί το προσκολλημένο λίπος αποτελούνται κατά μέσο όρο από 76% υγρασία, 21,5% αζωτούχες ενώσεις, 1,5% λιπίδια και 1% ανόργανα συστατικά. Το ποσοστό των υδατανθράκων ισούται με 0,05-0,2%. Οι μυϊκές πρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε συσταλτικές, διαλυτές και αδιάλυτες. Οι συσταλτικές πρωτεΐνες είναι κυρίως η μυοσίνη και η ακτίνη και αποτελούν το 65-70% των ολικών πρωτεϊνών. Οι διαλυτές πρωτεΐνες είναι κυρίως ένζυμα και μυογλοβίνη και αποτελούν το 25-30% των ολικών πρωτεϊνών. Τέλος, οι αδιάλυτες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν το κολλαγόνο και την ελαστίνη που προέρχονται κυρίως από τις μεμβράνες και το αδιάλυτο μέρος του μηχανισμού σύσπασης. Το κολλαγόνο αποτελεί το 20-25% του συνόλου των πρωτεϊνών στα θηλαστικά. Το περιεχόμενο σε αμινοξέα των πρωτεϊνών του μοσχαριού και του ψαριού αναφέρθηκε και στον πίνακα 1.2.

Γάλα

Η σύσταση του γάλακτος ποικίλει αναλόγως του ζώου από το οποίο προέρχεται. Σε κάθε περίπτωση, το κύριο συστατικό του γάλακτος είναι το νερό σε ποσοστό 63-87%. Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος βρίσκονται σε ποσοστό ~3,4%. Το καζεϊνικό κλάσμα αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών του γάλακτος, βρίσκεται κυρίως υπό τη μορφή μικκυλίων και περιέχει κυρίως τις πρωτεΐνες: α_{S1}-καζεΐνη, α_{S2}-καζεΐνη, β-καζεΐνη και κ-καζεΐνη. Από την άλλη, οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος αποτελούνται κυρίως από β-λακτογλοβουλίνη και α-λακταλβουμίνη. Το περιεχόμενο σε απαραίτητα αμινοξέα των πρωτεϊνών του γάλακτος αναφέρθηκε και στον πίνακα 1.2. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Sikorski, 2007)

Αυγά

Τα αυγά αποτελούνται από το λεύκωμα/ασπράδι, τον κρόκο και το κέλυφος. Το ασπράδι (αλβουμίνη) είναι ένα υδατικό διάλυμα 10% διαφόρων πρωτεϊνών. Η κύρια πρωτεΐνη είναι η ωοαλβουμίνη, η οποία είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με 3,2% υδατάνθρακες. Ο κρόκος των αυγών είναι ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό που αποτελείται από πρωτεΐνες (1/3) και λίπος (2/3). Οι πρωτεΐνες του κρόκου είναι κυρίως λιποβιτελλίνες και λιβετίνες. Τα αμινοξέα του αυγού (ασπραδιού και κρόκου) αναφέρθηκαν στον πίνακα 1.2.

Λαχανικά

Η σύσταση των λαχανικών ποικίλει αναλόγως του είδους και της προέλευσής τους. Η περιεκτικότητα σε υγρασία στα περισσότερα λαχανικά είναι ίση με 80-90%. Το ποσοστό του αζώτου είναι της τάξης του 1-5%, των υδατανθράκων 3-20%, των λιπιδίων 0,1-0,3%, των διαιτητικών ινών ~1% και των ανόργανων συστατικών ~1%. Το 35-80% των αζωτούχων ενώσεων είναι πρωτεΐνες. Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι ένζυμα που μπορεί να έχουν ευεργετική ή δυσμενή επίδραση. Επίσης υπάρχουν και ελεύθερα αμινοξέα, πέρα αυτών που δομούν τις πρωτεΐνες. Η σύσταση σε αμινοξέα από το πράσινο φασολάκι και τον αρακά παρατίθεται και στον πίνακα 1.2.

Δημητριακά

Η κύρια πηγή φυτικών πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου προέρχεται από τα δημητριακά (σιτηρά), τα οποία περιέχουν 7,5-14% πρωτεΐνες αναλόγως του είδους τους. Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από την κατανάλωση ψωμιού προσεγγίζουν το ένα τρίτο της ημερήσιας απαίτησης σε πρωτεΐνες. Το μειονέκτημα των πρωτεϊνών των δημητριακών είναι ότι έχουν χαμηλό ποσοστό λυσίνης, η οποία αποτελεί περιοριστικό αμινοξύ όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.2. για τον σίτο, το ρύζι, το καλαμπόκι και το κριθάρι. Οι πρωτεΐνες των δημητριακών είναι αλβουμίνες, γλοβουλίνες, γλουτελίνες και προλαμίνες. (Belitz et al., 2012, Sikorski, 2007)

Όσπρια

Τα όσπρια αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών για μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών περίπου 25%. Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι κυρίως αλβουμίνες, γλοβουλίνες και γλουτελίνες. Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στα διάφορα αμινοξέα των κουκιών παρουσιάστηκε στον πίνακα 1.2. (Belitz et al., 2012)

Ελαιούχοι σπόροι

Η σύσταση των ελαιούχων σπόρων ποικίλει αναλόγως του είδους τους. Η τυπική σύσταση των κυριότερων ελαιούχων σπόρων φαίνεται στον πίνακα 1.4. Οι ελαιούχοι σπόροι έχουν υψηλό περιεχόμενο σε έλαιο (17-49%), αλλά και πρωτεΐνες που μπορεί να φτάσει μέχρι και ποσοστό 40%. Οι πρωτεΐνες των ελαιούχων σπόρων είναι κυρίως γλοβουλίνες, αλλά και αλβουμίνες και γλουτελίνες. Το περιεχόμενο σε απαραίτητα αμινοξέα και η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών της σόγιας και της αραχίδας αναφέρθηκαν στον πίνακα 1.2. Μειονέκτημα των περισσότερων ελαιούχων σπόρων αποτελεί ότι έχουν χαμηλό ποσοστό μεθειονίνης, όπως συμβαίνει και στα λαχανικά. Επιπλέον, περιέχουν αντιθρεπτικούς παράγοντες και αναστολείς, όπως αναστολείς τρυψίνης, οι οποίοι απενεργοποιούνται με κατάλληλη θερμική διεργασία, η οποία βελτιώνει τη θρεπτική αξία και την ποιότητα των πρωτεϊνών. (Belitz et al., 2012, Damodaran, 2017, Oreopoulou & Tzia, 2007, Xu & Diosady, 2003)

Πίνακας 1.4. Τυπική σύσταση (%) των κυριότερων ελαιούχων σπόρων

Προέλευση: Chemat & Cravotto, 2013 μετά από προσαρμογή

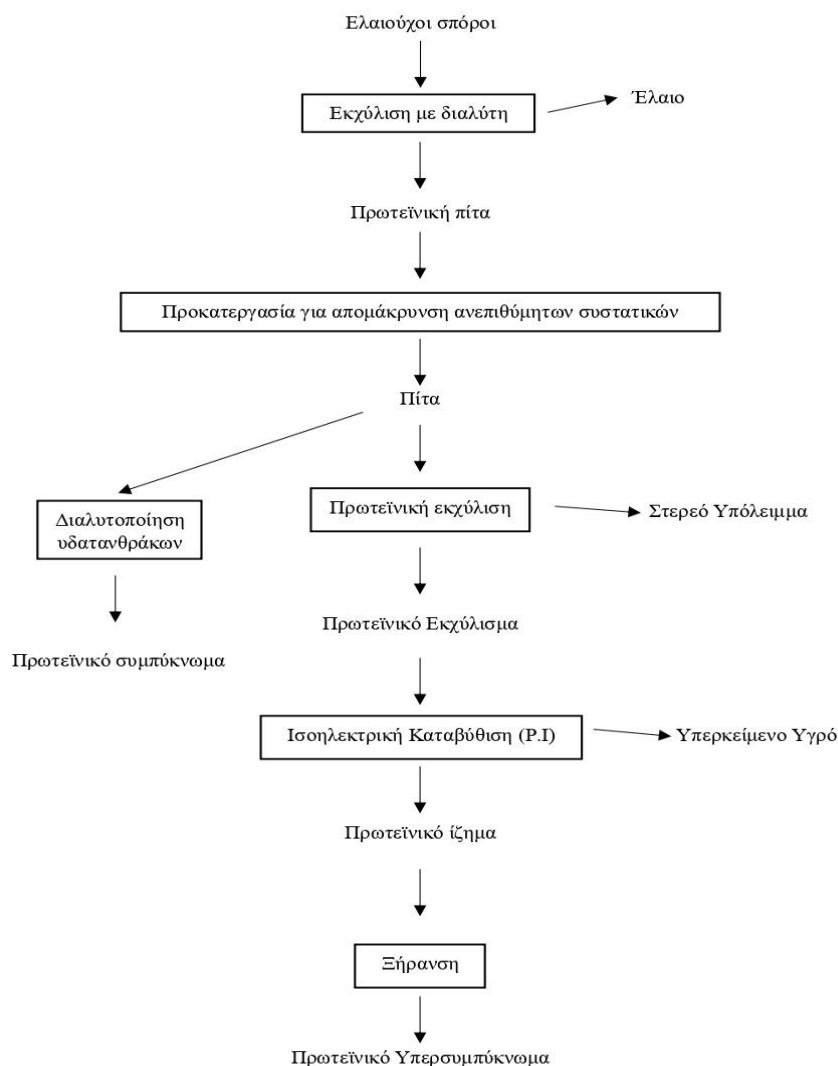
Ελαιούχοι Σπόροι	Υγρασία	Πρωτεΐνη	Λιπαρά	Ακατέργαστες ίνες	Τέφρα
Σόγια	8,5	36	20	5,0	4,9
Βαμβακόσπορος (αποϊνωμένος)	4,7	33	36	2,0	4,6
Ηλιόσπορος	5,4	23	47	4,2	4,0
Αραχίδα	6,5	26	49	4,9	2,3
Ελαιοκράμβη	7,5	23	40	6,7	4,5
Σησάμι	6,0	21	49	5,0	5,1

Κεφάλαιο 2 Τεχνολογία παραγωγής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων

Ο ρόλος των πρωτεϊνών στη διατροφή του ανθρώπου είναι πολύ σημαντικός λόγω της αυξημένης θρεπτικής τους αξίας. Πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται εκθετικά. Ειδικότερα, ο πληθυσμός αναμένεται να φτάσει τα 9 δισεκατομμύρια το 2050. Για αυτόν τον λόγο, νέες πηγές πρωτεϊνών είναι αναγκαίο να βρεθούν, οι οποίες θα πρέπει να περιέχουν πολλές πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας. Τέτοιες πηγές πρωτεϊνών προτείνεται να είναι φυτικές, παρά ζωικές για την ανθρώπινη κατανάλωση, διότι οι φυτικές πηγές παράγονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Ενδιαφέρον έχει η ανάκτηση πρωτεϊνών από παραπροϊόντα της φυτικής παραγωγής, λόγω του μεγάλου οικονομικού και περιβαλλοντικού αντίκτυπου των βιομηχανιών τροφίμων. Η φυτική πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για παραλαβή πρωτεϊνών ήταν η σόγια, όμως έχουν εξεταστεί και άλλοι ελαιούχοι σπόροι ή παραπροϊόντα που προκύπτουν ύστερα από την εκχύλιση του ελαίου τους. Όπως προαναφέρθηκε, οι ελαιούχοι σπόροι είναι πλούσιοι σε έλαιο και πρωτεΐνες. Οι πρωτεϊνικές πίτες, που προκύπτουν από τους ελαιούχους σπόρους μετά την εκχύλιση του ελαίου τους, περιέχουν πρωτεΐνες σε ποσοστό 15-50%, οπότε είναι ιδανικές για την ανάκτηση πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεϊνικές πίτες, αν και χρησιμοποιούνται κυρίως σε ζωοτροφές λόγω του χαμηλού κόστους τους, είναι σημαντικές πηγές πρωτεϊνών λόγω του υψηλού πρωτεϊνικού περιεχομένου, της υψηλής βιοδιαθεσιμότητας των αμινοξέων και επακολούθως της υψηλής θρεπτικής αξίας των πρωτεϊνών τους. Να σημειωθεί ότι οι ελαιούχοι σπόροι αντιπροσωπεύουν το 25% της παγκόσμιας παραγωγής φυτικών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η σόγια, η ελαιοκράμβη, ο βαμβακόσπορος, ο ηλιόσπορος και η αραχίδα, των οποίων η σύσταση αναφέρθηκε στον πίνακα 1.4., αντιπροσωπεύουν το 69%, 12,4%, 6,9%, 5,3% και 2,8% της παγκόσμιας παραγωγής πρωτεϊνικής πίτας, αντίστοιχα. Εκτός από τους ελαιούχους σπόρους και τα παραπροϊόντα τους, έχει εξεταστεί η ανάκτηση πρωτεϊνών από λαχανικά, όσπρια, δημητριακά και απόβλητα ή παραπροϊόντα βιομηχανικών επεξεργασιών τροφίμων, π.χ. ρίζες, βολβοί, φύλλα φυτών. Οι ελαιούχοι σπόροι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πρωτεϊνικών προϊόντων λόγω των αποθηκευτικών τους πρωτεϊνών, δηλαδή των πρωτεϊνών που παρέχουν τα απαραίτητα αζωτούχα συστατικά για την ανάπτυξη του νέου φυτού.

2.1 Πρωτεϊνικά προϊόντα

Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των ελαιούχων σπόρων χρησιμοποιούνται σε συστήματα τροφίμων για να αυξήσουν τη θρεπτική τους αξία και τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα μπορεί να είναι πρωτεϊνικά άλευρα (protein flours), πρωτεϊνικά συμπυκνώματα (protein concentrates) ή πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα (protein isolates), αναλόγως του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους και της μεθόδου παρασκευής τους. Ένα τυπικό διάγραμμα παραγωγής πρωτεϊνικών προϊόντων από ελαιούχους σπόρους παρουσιάζεται στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1. Αξιοποίηση ελαιούχων σπόρων για παραγωγή πρωτεϊνικών προϊόντων

Προέλευση: Ogeorouliou & Tzia, 2007 μετά από προσαρμογή

Τα πρωτεϊνικά άλευρα είναι τα απλούστερα και φθηνότερα πρωτεϊνικά προϊόντα, περιέχουν 50% πρωτεΐνες και προέρχονται από τη βιομηχανική διαδικασία απελαίωσης ελαιούχων σπόρων (oilseeds). Η εκχύλιση ελαίου από τους ελαιούχους σπόρους γίνεται συνήθως με χρήση διαλύτη συνήθως εξάνιο ή με μηχανική έκθλιψη ή και με συνδυασμό. Η πρωτεϊνική πίτα (protein meal) που αποτελεί πρώτη ύλη για ζωοτροφές, δεν πρέπει να συγχέεται ως έννοια με το πρωτεϊνικό άλευρο. Όταν οι πρωτεϊνικές πίτες, αλλά και τα πρωτεϊνικά άλευρα, προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να ληφθεί υπόψιν η ποιότητα των πρώτων υλών, η ανάγκη για πλήρη αποφλοιώση των σπόρων, ο βαθμός θερμικής κατεργασίας και η εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών υγιεινής κατά τη διεργασία. Πριν την εκχύλιση του ελαίου, οι ελαιούχοι σπόροι πρέπει να καθαρίζονται από ξένα υλικά, προσμίξεις και φλοιούς. Έπειτα, ξηραίνονται, θραύονται και, αφού απομακρυνθούν από αυτούς οι φλοιοί, κατεργάζονται υγροθερμικά μέχρι υγρασίας 10,5-11%. Στη συνέχεια, φολιδοποιούνται με πλάτος φολίδων (flakes) 0,20-0,35 mm. Μετά την εκχύλιση του ελαίου, στις απελαιωμένες

φολίδες γίνεται απομάκρυνση του διαλύτη με ατμό και φρυγάνισμα σε θερμοκρασία 93 °C για απενεργοποίηση ανεπιθύμητων ενζύμων και αναστολέων π.χ. αναστολείς τρυψίνης, αν οι φολίδες προορίζονται για ζωοτροφές. Αν οι φολίδες προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, γίνεται στιγμιαία απομάκρυνση του διαλύτη έτσι ώστε να προκύψουν ‘‘λευκές’’ απελαιωμένες φολίδες που είναι ιδανικές για ανθρώπινη κατανάλωση. Τέλος, αλέθονται στο επιθυμητό μέγεθος. Οι λευκές, απελαιωμένες, αλεσμένες φολίδες αποτελούν το πρωτεϊνικό άλευρο.

Τα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα περιέχουν τουλάχιστον 70% πρωτεΐνες και προκύπτουν από τα πρωτεϊνικά άλευρα με αφαίρεση των διαλυόμενων, μη πρωτεϊνικών συστατικών τους, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.1. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται εκχύλιση των υδατανθράκων, των αλάτων και άλλων χαμηλότερου μοριακού βάρους συστατικών από τις απελαιωμένες λευκές φολίδες, ενώ δεν εκχυλίζονται οι αδιάλυτες πρωτεΐνες. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει με υδατική αλκοόλη, με αραιό διάλυμα οξέος (pH 4,5) και με θερμό νερό ύστερα από μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τα προϊόντα που προκύπτουν με καθένα από αυτά τα μέσα έχουν διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες.

Κατά την εκχύλιση με υδατική αλκοόλη, χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα μεθανόλης, αιθανόλης ή ισοπροπανόλης (60-70% w/w) που έχει τη δυνατότητα εκχύλισης του διαλυτού κλάσματος των υδατανθράκων, χωρίς να επηρεάζονται οι πρωτεΐνες. Ταυτοχρόνως, απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες φαινόλες, απενεργοποιούνται οι αναστολείς τρυψίνης και βελτιώνεται η ποιότητα των τελικών προϊόντων. Το τελικό συμπύκνωμα παραλαμβάνεται με απομάκρυνση της αλκοόλης μέσω επαφής με τους υπέρθερμους ατμούς του και με άλεση των φολίδων.

Όσον αφορά την εκχύλιση με αραιό διάλυμα οξέος, οι απελαιωμένες λευκές φολίδες ή το πρωτεϊνικό άλευρο διαλύονται σε αραιό διάλυμα οξέος χαμηλού pH (4,5 για τη σόγια) και με φυγοκέντρηση τα στερεά διαχωρίζονται από το εκχύλισμα που περιέχει τις προσμίξεις. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα των πρωτεϊνών είναι ελάχιστη στο ισοηλεκτρικό σημείο τους, ενώ στην ίδια τιμή pH οι υδατάνθρακες διαλύονται. Τα αδιάλυτα στερεά που ονομάζονται ‘‘ισοηλεκτρικό’’ συμπύκνωμα υπόκεινται σε ξήρανση ή ακολουθούν τις διεργασίες επαναδιαλυτοποίησης, εξουδετέρωσης, φυγοκέντρησης και ξήρανσης υπό ψεκάσμο.

Τέλος, η εκχύλιση των μη πρωτεϊνικών συστατικών μπορεί να γίνει με χρήση θερμού νερού ύστερα από μετουσίωση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η μετουσίωση των πρωτεϊνών γίνεται με φρυγάνισμα που ακολουθείται από εκχύλιση σε θερμό νερό (66-93 °C) με ρύθμιση του pH σε τιμές 5,0-7,5. Με τη μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μείωση της διαλυτότητάς τους, ενώ μεγιστοποιείται η διαλυτότητα των υδατανθράκων.

Τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα έχουν πρωτεϊνικό περιεχόμενο άνω του 90% και προέρχονται από το πρωτεϊνικό άλευρο με εκχύλιση, καταβύθιση και ξήρανση των πρωτεϊνών, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.1. Σε αντίθεση με τα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα, κατά τη διεργασία παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων οι

πρωτεΐνες διαλύονται, ενώ οι περισσότερες προσμίξεις παραμένουν στο στερεό υπόλειμμα. Πρώτη ύλη για την παραγωγή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων αποτελούν συνήθως οι απειλαιωμένες λευκές φολίδες, επειδή η ύπαρξη ελαίου μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό γαλακτώματος. Η διαδικασία παραγωγής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων θα αναλυθεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο. (Gençdağ et al., 2020, Gharib-Bibalan, 2018, Moure et al., 2006, Oreopoulou & Tzia, 2007, Pojić et al., 2018, Xu & Diosady, 2003, Λιαδάκης, 1999)

2.2 Διαδικασία εκχύλισης πρωτεϊνών και παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων

Τα τρία κύρια βήματα παραγωγής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων είναι: (1) εκχύλιση των πρωτεϊνών, (2) καταβύθιση των πρωτεϊνών και (3) ξήρανση των καταβυθισμένων πρωτεϊνών. Αν στόχος είναι η εφαρμογή των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων σε συστήματα τροφίμων, συχνά χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους αλκαλικό διάλυμα ($\text{pH} > 7,5$) για την εκχύλιση των πρωτεϊνών για επαρκή χρονικό διάστημα, η οποία ακολουθείται από οξίνιση στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών (pH 4 με 5) όπου υφίσταται η μέγιστη καταβύθισή τους. Οι μέθοδοι εκχύλισης/καταβύθισης εκτός από αλκαλική εκχύλιση/ισοηλεκτρική καταβύθιση, μπορεί να είναι όξινη εκχύλιση/ισοηλεκτρική καταβύθιση, υδατική (ουδέτερη) εκχύλιση/ισοηλεκτρική καταβύθιση και εκχύλιση με διάλυμα άλατος (π.χ. Na_2CO_3 , NaCl)/καταβύθιση μικκυλίων. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει και με διήθηση ή υπερδιήθηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στάδια της εκχύλισης και καταβύθισης των πρωτεϊνών σχετίζονται άμεσα με τη διαλυτότητά τους και είναι σημαντικά για την ολική απόδοση της διεργασίας. Για αυτόν τον λόγο είναι σημαντική και η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. (Gençdağ et al., 2020, Görgüç et al., 2019, Moure et al., 2006, Oreopoulou & Tzia, 2007, Sathe et al., 1984, Λιαδάκης, 1999)

Οι αλεσμένες λευκές φολίδες, δηλαδή το πρωτεϊνικό αλεύρο, που θα χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και την παραλαβή των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων θα πρέπει να είναι απειλαιωμένες και να έχουν υποστεί την ελάχιστη δυνατή θερμική επεξεργασία. Επιπλέον, απαραίτητη είναι η προκατεργασία τους για αφαίρεση τυχόν ανεπιθύμητων ή τοξικών ουσιών.

Ακολουθεί η ανάμειξη του απειλαιωμένου αλεύρου με τον διαλύτη σε δοχείο με θέρμανση, σε σταθερή θερμοκρασία υπό ανάδευση και ρύθμιση του pH . Οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι το pH , ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, ο διαλύτης, ο λόγος στερεού/διαλύτη, η ανάδευση και η κοκκομετρία της πρώτης ύλης. Οι συνθήκες εκχύλισης πρέπει να είναι τέτοιες, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη διαλυτότητα των πρωτεϊνών, δίχως όμως αυτές να επηρεάζονται. Επειδή από την απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται η απόδοση όλης της διεργασίας, είναι σημαντικό να γίνει βελτιστοποίηση των παραμέτρων για μεγιστοποίηση της απόδοσης εκχύλισης. Γενικά όσο αυξάνεται η τιμή του pH , η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης, ο διαλύτης και η ανάδευση, τόσο αυξάνεται η

απόδοση της εκχύλισης. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από τη διαλυτότητα των αποθηκευτικών πρωτεϊνών των ελαιούχων σπόρων. Όπως έχει αναφερθεί, οι αλβουμίνες είναι διαλυτές στο νερό (pH 6-8), οι γλοβουλίνες σε αραιά διαλύματα αλάτων, οι προλαμίνες στην αιθανόλη 50-90° και οι γλουτελίνες σε αραιά όξινα ή αλκαλικά διαλύματα. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως με χρήση νερού ως διαλύτη και ρύθμιση του pH σε τιμές 8-10 π.χ. με χρήση NaOH. Σε αλκαλικές τιμές pH και θερμοκρασίες 50-55 °C, οι περισσότερες πρωτεΐνες ελαιούχων σπόρων είναι διαλυτές. Ωστόσο, σε υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας και pH ενδεχομένως να προκύψουν ανεπιθύμητες μεταβολές, όπως μετουσίωση των πρωτεϊνών, χημικές αλλαγές των αμινοξέων ή σχηματισμός ενώσεων με υδατάνθρακες (αντιδράσεις Maillard). Επιπροσθέτως, έχουν χρησιμοποιηθεί και διαλύματα αλάτων ως διαλύτες της εκχύλισης πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα διαλύματα NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₃, Na₂SO₄, MgSO₄ και CaCl₂. Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης, η ανάδευση και η κοκκομετρία της πρώτης ύλης πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Συνήθως, ο χρόνος εκχύλισης κυμαίνεται στις τιμές 45-60 min και η ανάδευση είναι τέτοια, ώστε να ενισχύεται η εκχύλιση, χωρίς να καταστρέφονται οι φολίδες. Τέλος, όσο αυξάνεται ο όγκος του διαλύτη, τόσο αυξάνεται ο βαθμός εκχύλισης, αλλά λόγω του κόστους του διαλύτη και της χρήσης μεγάλων εκχυλιστήρων, πρέπει να γίνει οικονομική αριστοποίηση του λόγου στερεού/διαλύτη, ο οποίος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ των τιμών 1:10 και 1:20.

Μετά την εκχύλιση, ακολουθεί επαρκής διαχωρισμός του στερεού υπολείμματος από το εκχύλισμα των πρωτεϊνών. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με διήθηση και έπειτα με φυγοκέντρηση του εκχυλισμένου αιωρήματος. Το στερεό υπόλειμμα περιέχει τα μη πρωτεϊνικά συστατικά, κυρίως φυτικές ίνες, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ζωοτροφές. Στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθεται κατάλληλο για τα τρόφιμα οξύ, όπως οξικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ ή φωσφορικό οξύ, και ρυθμίζεται το pH στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Στο σημείο αυτό συμβαίνει μέγιστη καταβύθιση των πρωτεϊνών και σχηματισμός του πρωτεϊνικού ιζήματος. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του ιζήματος, η έκπλυσή του με διάλυση σε νερό και επακόλουθη φυγοκέντρηση και ξήρανση, συνήθως με ψεκασμό. Το τελικό πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα συνήθως εξουδετερώνεται με κατάλληλο αλκαλικό διάλυμα. Το υπερσυμπύκνωμα αποτελεί το 1/3 της αρχικής πρώτης ύλης και δεν πρέπει να περιέχει ανεπιθύμητη γεύση, οσμή, χρώμα, αλλά και ανεπιθύμητες τοξικές ουσίες. Εκτός από την ισοηλεκτρική καταβύθιση, η παραλαβή των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων μπορεί να γίνει με μεμβράνες υπερδιήθησης ή με καταβύθιση μικκυλίων. Στην υπερδιήθηση χρησιμοποιούνται μεμβράνες 10.000-100.000 MWCO, ενώ στην καταβύθιση μικκυλίων οι πρωτεΐνες σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου και καταβυθίζονται ως δομές μικκυλίων. (Gençdağ et al., 2020, Moure et al., 2006, Oreopoulou & Tzia, 2007, Xu & Diosady, 2003, Λιαδάκης, 1999)

2.3 Νέες τεχνολογίες-μέθοδοι εκχύλισης

Υπάρχουν διάφορες συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών μορίων από φυτικές πρώτες ύλες και ειδικότερα ελαιούχους σπόρους, όπως η εκχύλιση με χρήση διαλύτη, η ψυχρή έκθλιψη και η θέρμανση με χρήση αντλίας. Η εκχύλιση με χρήση διαλύτη περιλαμβάνει τη μεταφορά των προς εκχύλιση ουσιών από ένα στερεό υλικό στον διαλύτη. Αυτή βασίζεται κυρίως στη χρήση ισχυρού διαλύτη και στη χρήση θερμότητας και ανάδευσης. Ο διαλύτης είναι αυτός από τον οποίο εξαρτάται περισσότερο η απόδοση της εκχύλισης και η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από την πολικότητα της εκχυλιζόμενης ένωσης, αλλά και από τη χημική συγγένεια διαλύτη-ένωσης, από τη μεταφορά μάζας, την τοξικότητα, το κόστος και τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Η εκχύλιση θεωρείται επιτυχής όταν τα προς εκχύλιση συστατικά διαλύονται και μεταφέρονται στον όγκο του διαλύτη έως επίτευξης μίας συγκέντρωσης ισορροπίας.

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης έχουν όμως κάποια μειονεκτήματα. Αυτά είναι το κόστος και ο όγκος του απαιτούμενου διαλύτη, η τοξικότητα του διαλύτη, η χαμηλή εκλεκτικότητα του διαλύτη, αλλά και ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης, τα υψηλά ποσοστά ενέργειας που απαιτούνται, η χαμηλή απόδοση, η μη βιωσιμότητα της διεργασίας και το περιβαλλοντικό ρίσκο.

Επιπλέον, οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης δεν επαρκούν για την εκχύλιση μεγάλων και σύνθετων πολυμερικών μορίων, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες. Αυτό οφείλεται στο ότι ο διαλύτης δεν μπορεί να εισχωρήσει επαρκώς στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, που αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη. Άλλοι πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι οι ημικυτταρίνες, οι πηκτίνες και η λιγνίνη που αποτελούν και αυτά φυσικά φράγματα, εμποδίζοντας την απελευθέρωση των προς εκχύλιση μορίων. Η εκχύλιση δυσχεραίνεται από υδροκολλοειδή που υπάρχουν στους ιστούς των φυτών και είναι υδρόφιλα πολυμερή (σύνθετοι υδατάνθρακες και σύνθετες πρωτεΐνες), αλλά και από φαινολικές ενώσεις που τυχόν συνδέονται στους πολυσακχαρίτες με υδρόφοβους δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου ή δημιουργούν κλειστές δομές.

Όσον αφορά την εκχύλιση πρωτεϊνών από δημητριακά και πίτουρα, υπάρχει αυξημένη δυσκολία λόγω του μεγάλου ποσοστού φυτικών ινών που είναι συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες. Για αυτόν τον λόγο, είναι αναγκαία η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και η χρήση πολύ αλκαλικών διαλυμάτων (υψηλές τιμές pH), ώστε να διαλυθούν και να εκχυλιστούν περισσότερες πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο όμως μπορεί να συμβούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις, μετουσίωση και διάσπαση των πρωτεϊνών, θρεπτική υποβάθμισή τους, απώλεια ορισμένων αμινοξέων και παραγωγή πιο πικρών πεπτιδίων που προκύπτουν από μερική υδρόλυση των πρωτεϊνών. Έτσι, δυσχεραίνεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος και η εύρεση βέλτιστων συνθηκών της διεργασίας.

Λόγω αυτών των μειονεκτημάτων των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, νέες τεχνολογίες-μέθοδοι εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Οι νέες

μέθοδοι εκχύλισης είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης χρήσης συνθετικών και οργανικών ενώσεων και της μείωσης εκπομπής αερίων του θερμοκηπίου. Αυξάνουν την απόδοση της εκχύλισης και την ποιότητα και λειτουργικότητα των τελικών προϊόντων, ενώ μειώνουν την κατανάλωση και το κόστος ενέργειας και τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης χρησιμοποιώντας ήπιες θερμοκρασίες (χαμηλότερες των συμβατικών). Επιπλέον, προσφέρουν λιγότερο επεξεργασμένα προϊόντα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των καταναλωτών, και ενισχύουν τον ανταγωνισμό των βιομηχανιών τροφίμων όσον αφορά στη βιωσιμότητα, την οικονομία και την καινοτομία.

Οι νέες μέθοδοι εκχύλισης αυξάνουν την απόδοση και επιταχύνουν τη διεργασία της εκχύλισης. Αρχικά, οι νέες μέθοδοι εκχύλισης αυξάνουν με διάφορους τρόπους την κυτταρική διαπερατότητα, τη διάχυση του διαλύτη στο εσωτερικό του κυττάρου και την απελευθέρωση των εκχυλιζόμενων συστατικών προς το εξωτερικό του κυττάρου. Έτσι, αυξάνουν και επιταχύνουν την αποικοδόμηση και τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών των φυτικών πρώτων υλών, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός μεταφοράς μάζας. Άρα, στόχος των νέων μεθόδων εκχύλισης είναι η ρήξη των κυττάρων των φυτών για αύξηση της απόδοσης, χωρίς τη χρήση μηχανικής, θερμικής ή χημικής μεθόδου.

Οι νέες μέθοδοι εκχύλισης είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, μικροκύματα, παλμικά ηλεκτρικά πεδία, ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, υψηλή υδροστατική πίεση, ένζυμα, ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης, όπως και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, η εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση, η εκχύλιση με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες κλπ. Κάποιες από τις παραπάνω μεθόδους θεωρούνται “πράσινες μέθοδοι” σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Προστασίας Περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency- EPA).

Οι νέες μέθοδοι εκχύλισης αυξάνουν τον ρυθμό μεταφοράς μάζας λόγω της φύσης τους και για αυτόν τον λόγο δεν απαιτούν υψηλά επίπεδα διαλύτη, υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές τιμές pH και μεγάλους χρόνους εκχύλισης, σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Σκοπός τους είναι, δηλαδή, η μείωση του χρόνου εκχύλισης και του απαιτούμενου διαλύτη. (Azmir et al., 2013, Chemat et al., 2017, Gençdağ et al., 2020, Gharib-Bibalan, 2018, Görgüç et al., 2019, Kumari et al., 2018, Pojić et al., 2018, Sathe et al., 1984)

Οι νέες μέθοδοι εκχύλισης που θα μελετηθούν πειραματικά είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα και η εκχύλιση με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμική μέσω της αλληλεπίδρασής της με τα πολικά μόρια της πρώτης ύλης και του διαλύτη. Η μεταφορά θερμότητας γίνεται μέσω των μηχανισμών της ιοντικής αγωγιμότητας και της διπολικής περιστροφής των μορίων, κατά τις οποίες δεν υπάρχουν απώλειες θερμότητας στο περιβάλλον. Η ιοντική αγωγιμότητα αφορά τη ροή των φορτισμένων ιόντων στον διαλύτη και η διπολική περιστροφή αφορά την

ευθυγράμμιση των διπόλων των πολικών μορίων με το εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία πίεσης στα κυτταρικά τοιχώματα, η διάρρηξη των κυττάρων και η απελευθέρωση των εκχυλιζόμενων συστατικών στον διαλύτη. Από την άλλη μεριά, η χρήση των ενζύμων κατά την εκχύλιση βασίζεται στη δράση συγκεκριμένων ενζύμων να καταλύουν τη διάσπαση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης ή/και της πηκτίνης, που είναι τα κύρια συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και των κυτταρικών ιστών. Έτσι, καταστρέφονται τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνονται τα εκχυλιζόμενα συστατικά, π.χ. οι πρωτεΐνες. Επιπλέον, η εφαρμογή άλλων ενζύμων αφορά την αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, η οποία στοχεύει επίσης στην αύξηση του βαθμού εκχύλισής τους. Τέλος, οι φυσικοί βαθώς ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούνται από μία συγκεκριμένη αναλογία ενός δέκτη και ενός δότη δεσμού υδρογόνου και λόγω του ότι δίνουν και δέχονται ηλεκτρόνια, διαλύουν πιο εύκολα τα εκχυλιζόμενα συστατικά σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες. Η υψηλή διαλυτότητά τους σχετίζεται άμεσα με το μεγάλο εύρος της πολικότητάς τους. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από φυσικούς βαθώς ευτηκτικούς διαλύτες αποτελεί μία πράσινη μέθοδο εκχύλισης, φιλική προς το περιβάλλον. Οι προαναφερθείσες νέες μέθοδοι εκχύλισης θα αναλυθούν λεπτομερώς.

2.3.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave assisted extraction, MAE)

Γενικά

Μία νέα μέθοδος εκχύλισης είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Μαζί με την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, που θα αναλυθεί στη συνέχεια, αποτελούν τις μεθόδους με τη μικρότερη κατανάλωση ενέργειας και το μικρότερο κόστος. Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα με συχνότητα από 300 MHz μέχρι 300 GHz και αποτελούνται από δύο πεδία, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο. Γενικά, χρησιμοποιούνται στη σημερινή εποχή στις κεραίες επικοινωνιών, ραδιοφωνίας και τηλεόρασης και στους φούρνους μικροκυμάτων. Οι φούρνοι μικροκυμάτων εκτός από τις διεργασίες εκχύλισης χρησιμοποιούνται για διεργασίες ξήρανσης, μέτρησης υγρασίας, αλλά και γενικότερα αντί για εστίες θέρμανσης. (Azmir et al., 2013, Mandal et al., 2007, Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000)

Αρχή και Μηχανισμός της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα βασίζεται σε φαινόμενα μεταφοράς μάζας και ενέργειας που συμβαίνουν προς την ίδια κατεύθυνση. Στη συμβατική εκχύλιση, η μεταφορά μάζας γίνεται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του υλικού και η μεταφορά ενέργειας γίνεται από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του υλικού. Αντίθετα, στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα η μεταφορά ενέργειας, όπως και η μεταφορά μάζας, γίνεται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του υλικού και για αυτόν τον λόγο η θερμότητα διαχέεται σε όλον τον όγκο του υλικού με ομοιόμορφο τρόπο.

Όπως προαναφέρθηκε, ο μηχανισμός θερμότητας των μικροκυμάτων αφορά τη μετατροπή της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας, που εφαρμόζεται κατευθείαν στο διάλυμα, σε θερμική ενέργεια και βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μικροκυμάτων με πολικά μόρια. Τα μικροκύματα αλληλεπιδρούν με τα πολικά μόρια του υλικού και του διαλύτη για τη δημιουργία θερμότητας. Η μεταφορά θερμότητας γίνεται μέσω των μηχανισμών της ιοντικής αγωγιμότητας και της διπολικής περιστροφής των μορίων, που γίνονται συνήθως ταυτόχρονα. Σε αντίθεση με τη συμβατική θέρμανση που γίνεται με αγωγή και συναγωγή, στη θέρμανση με μικροκύματα, δηλαδή κατά τα φαινόμενα της ιοντικής αγωγιμότητας και της διπολικής περιστροφής, δεν υπάρχουν σημαντικές απώλειες θερμότητας στο περιβάλλον. Η ιοντική αγωγιμότητα αναφέρεται στην ιοντική μετανάστευση, δηλαδή στη ροή των φορτισμένων ιόντων στον διαλύτη όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Λόγω της αντίστασης του διαλύματος στη ροή των ιόντων, δημιουργείται τάση ανάμεσα στα ιόντα και στα μόρια του διαλύματος και έτσι παράγεται θερμότητα. Η διπολική περιστροφή αφορά την ευθυγράμμιση των διπόλων των πολικών μορίων με το εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο. Επειδή η διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου αλλάζει συνεχώς, τα μόρια δεν 'προλαβαίνουν' να προσανατολιστούν και να ευθυγραμμιστούν με το πεδίο και έτσι ξεκινά η δόνησή τους, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία τριβής και την παραγωγή θερμότητας. Η θερμότητα παράγεται σε συχνότητα μικροκυμάτων ίση με 2.450 MHz όπου τα δίπολα ευθυγραμμίζονται $4,9 \cdot 10^9$ φορές/s.

Ο βαθμός απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας μικροκυμάτων από το διάλυμα και ο βαθμός μετατροπής της σε θερμότητα εξαρτώνται από τη φύση του διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, εξαρτώνται από την εφαπτομένη απωλειών $\tan\delta$, η οποία ορίζεται ως εξής:

$$\tan\delta = \epsilon'' / \epsilon' \quad (\text{εξίσωση 12})$$

όπου ϵ'' είναι το φανταστικό μέρος της σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς (ϵ) του διαλύτη (απώλεια ενέργειας) και σχετίζεται με τον βαθμό μετατροπής ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας σε θερμότητα και ϵ' είναι το πραγματικό μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύτη (αποθήκευση ενέργειας) και σχετίζεται με τον βαθμό απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι μόνο πολικά μόρια, δηλαδή μόνιμα ηλεκτρικά δίπολα μπορούν να θερμανθούν με εφαρμογή μικροκυμάτων. Πολικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές μικροκυμάτων είναι το νερό, η αιθανόλη, η μεθανόλη κ.α. (Azmir et al., 2013, Chemat & Cravotto, 2013, Ekezie et al., 2017, Mandal et al., 2007, Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα περιλαμβάνει τρία στάδια: (1) τον διαχωρισμό των προς εκχύλιση συστατικών από τη μήτρα του φυτού λόγω αυξημένης πίεσης και θερμοκρασίας, (2) τη διάχυση του διαλύτη στη μήτρα του φυτού και (3) την απελευθέρωση των συστατικών στον διαλύτη. Ο διαχωρισμός των προς εκχύλιση συστατικών από τη μήτρα του φυτού βασίζεται στη θέρμανση της υγρασίας, δηλαδή των πολικών μορίων νερού, των κυττάρων του φυτού με μικροκύματα. Όταν τα

μικροκύματα έρχονται σε επαφή με την υγρασία των κυττάρων, συμβαίνει εξάτμιση της υγρασίας, διόγκωση του κυττάρου και επακολούθως δημιουργία πίεσης στα κυτταρικά τοιχώματα. Έτσι, τα κυτταρικά τοιχώματα διαρρηγνύονται, οι πόροι της μήτρας του φυτού αυξάνονται σε αριθμό, ο διαλύτης εισχωρεί σε μεγαλύτερο βαθμό στη μήτρα και το περιεχόμενο των κυττάρων μαζί με τα προς εκχύλιση συστατικά απελευθερώνονται στον διαλύτη. Να σημειωθεί πως ακόμα και αν το δείγμα είναι ξηρό, ίχνη υγρασίας υπάρχουν μέσα στα κύτταρα. (Azmir et al., 2013, Chemat & Cravotto, 2013, Ekezie et al., 2017, Gharib-Bibalan, 2018, Mandal et al., 2007)

Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση και Εξοπλισμός

Η απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενη από μικροκύματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του διαλύτη. Όπως προαναφέρθηκε, μπορούν να θερμανθούν με εφαρμογή μικροκυμάτων πολικοί διαλύτες, οι οποίοι αποτελούνται από μόνιμα ηλεκτρικά δίπολα. Ο βαθμός απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας μικροκυμάτων από το διάλυμα και ο βαθμός μετατροπής της σε θερμότητα εξαρτώνται από την εφαπτομένη $\tan\delta$ που είναι χαρακτηριστική για κάθε διαλύτη. Στον πίνακα 2.1. φαίνονται κάποια από τα φυσικά χαρακτηριστικά και η τιμή $\tan\delta$ των συνηθέστερων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Πίνακας 2.1. Φυσικά χαρακτηριστικά και εφαπτομένη απωλειών διαφόρων διαλυτών

Προέλευση: Chemat & Cravotto, 2013 μετά από προσαρμογή

Διαλύτης	Πραγματικό μέρος διηλεκτρικής σταθεράς ^α (ϵ')	Εφαπτομένη $\tan\delta$ (10^{-4})	Σημείο ζέσεως ^β ($^{\circ}\text{C}$)	Ιξώδες ^γ (cP)
Ακετόνη	20,7	5.555	56	0,30
Ακετονιτρίλιο	37,5	-	82	-
Αιθανόλη	24,3	2.500	78	0,69
Εξάνιο	1,89	-	69	0,30
Μεθανόλη	32,6	6.400	65	0,54
2-Προπανάλη	19,9	6.700	82	0,30
Νερό	78,3	1.570	100	0,89
Οξικός αιθυλεστέρας	6,02	5.316	77	0,43
Εξάνιο-Ακετόνη (1:1)	-	-	52	-

^α Προσδιορισμένο στους 20 $^{\circ}\text{C}$

^β Προσδιορισμένο σε 101,4 kPa

^γ Προσδιορισμένο στους 25 $^{\circ}\text{C}$

Μία σύγκριση των διαλυτών μεθανόλης και νερού δείχνει ότι με χρήση μεθανόλης απορροφάται λιγότερη ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μικροκυμάτων, αλλά μετατρέπεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε θερμότητα, σε σχέση με το νερό. Εκτός από την εφαπτομένη $\tan\delta$ και τη διηλεκτρική σταθερά, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από

μικροκύματα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του διαλύτη με τη μήτρα του φυτού, τη διαλυτότητα των προς εκχύλιση συστατικών στον διαλύτη και την εκλεκτικότητα του διαλύτη ως προς τα συστατικά αυτά. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη ως προς τα προς εκχύλιση συστατικά μπορεί να μεταβληθεί με συνδυασμό διαφόρων διαλυτών. Πιο συγκεκριμένα, στην εκχύλιση με μικροκύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ένας ή περισσότεροι διαλύτες που απορροφούν σε υψηλό βαθμό ενέργεια μικροκυμάτων (υψηλή τιμή $\tan\delta$) π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη, νερό, είτε μείγμα διαλυτών που εμφανίζουν και υψηλή και χαμηλή τιμή $\tan\delta$ π.χ. αιθανόλη και εξάνιο, είτε οποιοσδήποτε πολικός ή μη πολικός διαλύτης π.χ. εξάνιο, αρκεί το υλικό που δέχεται την ενέργεια μικροκυμάτων να έχει υψηλό περιεχόμενο νερού. Συνήθως, χρησιμοποιείται εξάνιο στην εκχύλιση θερμοευαίσθητων και πτητικών υλικών. Επίσης, άλατα μπορούν να προστεθούν στον διαλύτη για αύξηση του φαινομένου της ιοντικής αγωγιμότητας και επακολούθως για αύξηση του ρυθμού θέρμανσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο βέλτιστος διαλύτης για τη συμβατική εκχύλιση δεν δύναται να επιλεγεί ως βέλτιστος για την αντίστοιχη εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα εξαρτάται και από τον όγκο του διαλύτη. Ο όγκος του διαλύτη πρέπει να αρκετός, ώστε να εμβαπτιστεί όλο το δείγμα μέσα σε αυτόν σε όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, ειδικότερα όταν χρησιμοποιείται δείγμα που δύναται να διογκωθεί. Ενώ στη συμβατική εκχύλιση η απόδοση αυξάνεται με αύξηση του διαλύτη, στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με αύξηση του όγκου του διαλύτη η απόδοση μπορεί να μειωθεί, λόγω ανομοιόμορφης κατανομής των μικροκυμάτων στο διάλυμα. Επιπλέον, με αύξηση του διαλύτη αυξάνεται η κατανάλωση ενέργειας και ο απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης. Για τους παραπάνω λόγους, το διάλυμα που εκχυλίζεται δεν πρέπει να ξεπερνά τη συγκέντρωση 30-34% w/v.

Εκτός από το είδος και τον όγκο του διαλύτη, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα εξαρτάται από τον χρόνο εκχύλισης, την ισχύ των μικροκυμάτων, τη θερμοκρασία, το ποσοστό νερού και τα χαρακτηριστικά του δείγματος, την προκατεργασία του δείγματος, την ανάδευση, την πίεση κ.α. Γενικά με αύξηση του χρόνου εκχύλισης αυξάνεται η απόδοσή της, αλλά λίγα λεπτά έως μισή ώρα αρκούν στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Έτσι, δεν θα προκύψουν ανεπιθύμητες μεταβολές, όπως θερμική υποβάθμιση και οξείδωση των προς εκχύλιση συστατικών, ακόμα και αν είναι θερμοευαίσθητα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι με περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης, η απόδοση δεν αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό. Όταν, όμως, απαιτείται μεγάλος χρόνος εκχύλισης και χρησιμοποιείται κάποιος διαλύτης που απορροφά σε υψηλό βαθμό ενέργεια μικροκυμάτων, αυξάνεται πολύ ο ρυθμός θέρμανσης του διαλύματος και για αυτόν τον λόγο το δείγμα μπορεί να υποστεί επαναλαμβανόμενους κύκλους εκχύλισης μικρότερου χρόνου, αντί για έναν μεγαλύτερο κύκλο εκχύλισης. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα εξαρτάται και από την ισχύ των μικροκυμάτων και τη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται. Η επιλογή της κατάλληλης τιμής ισχύος εξαρτάται από τη μάζα του δείγματος που εκχυλίζεται και από τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης. Με αύξηση της ισχύος των

μικροκυμάτων, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης και μειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος. Σε υψηλές τιμές ισχύος επιτυγχάνονται υψηλές τιμές θερμοκρασίας (άνω του σημείου ζέσεως του διαλύτη) και με τη θερμότητα να λειτουργεί ως κινητήρια δύναμη, αυξάνεται η εκρόφηση των προς εκχύλιση συστατικών από τη μήτρα του φυτού, αυξάνεται η διαλυτότητα των προς εκχύλιση συστατικών στον διαλύτη και μειώνεται η επιφανειακή τάση και το ιξώδες του διαλύτη με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη εισχώρηση του διαλύτη στη μήτρα του φυτού. Όμως, σε πολύ υψηλές τιμές θερμοκρασίας ή με απότομη αύξησή της παρατηρείται θερμική υποβάθμιση των προς εκχύλιση συστατικών και απότομη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η απότομη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη διάλυση προσμίξεων στον διαλύτη, πέρα των προς εκχύλιση συστατικών. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η απόδοση της εκχύλισης. Επιπροσθέτως, όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του υλικού, η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από την κοκκομετρία του υλικού και το περιεχόμενο του σε νερό. Συνήθως, η πρώτη ύλη αλέθεται έως 100 μm -2 mm, ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής του υλικού με τον διαλύτη και ακολούθως η διείσδυση του διαλύτη στο υλικό. Όμως, με αυτόν τον τρόπο δυσχεραίνεται η μετέπειτα απομάκρυνση των επιθυμητών συστατικών από τον διαλύτη. Επιπλέον, όσο περισσότερο νερό περιέχει το δείγμα, τόσο αυξάνεται η πίεση μέσα στα κύτταρα και η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και κατά συνέπεια η απόδοση της εκχύλισης. Σε μερικές περιπτώσεις, το δείγμα μπορεί να εμβαπτιστεί στον διαλύτη πριν από τη διεργασία της εκχύλισης με σκοπό την αύξηση της απόδοσης. Τέλος, η εκχύλιση βελτιώνεται με αύξηση της πίεσης και με εφαρμογή ανάδευσης, αυξάνοντας έτσι τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. (Chemat & Cravotto, 2013, Mandal et al., 2007, Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000)

Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα είναι σημαντικό το είδος των εκχυλιστήρων. Καταρχάς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε συστήματα κλειστού τύπου, είτε συστήματα ανοιχτού τύπου. Στα συστήματα κλειστού τύπου η εκχύλιση διεξάγεται με ρύθμιση της θερμοκρασίας και της πίεσης, ενώ στα συστήματα ανοιχτού τύπου η εκχύλιση διεξάγεται σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα παραπάνω συστήματα μπορεί να είναι είτε πολλαπλών λειτουργιών, είτε απλής ή εστιασμένης λειτουργίας. Στην απλή ή εστιασμένη λειτουργία, τα μικροκύματα ακτινοβολούνται στη συγκεκριμένη θέση του δείγματος, ενώ στα συστήματα πολλαπλών λειτουργιών τα μικροκύματα ακτινοβολούνται με τυχαίο τρόπο. Οι οικιακοί φούρνοι μικροκυμάτων ανήκουν στα συστήματα πολλαπλών λειτουργιών ανοιχτού τύπου. Κάθε σύστημα μικροκυμάτων αποτελείται από τη γεννήτρια μικροκυμάτων που παράγει ενέργεια μικροκυμάτων, τον κυματοδηγό που χρησιμοποιείται για τη διάδοση των μικροκυμάτων, τον θάλαμο στον οποίο τοποθετείται το δείγμα και τον κυκλοφορητή που επιτρέπει τη διάδοση του κύματος σε κατεύθυνση προς τα εμπρός. Στα συστήματα κλειστού τύπου επιτυγχάνονται υψηλότερες θερμοκρασίες, δεν υφίστανται απώλειες των πτητικών συστατικών, απαιτείται λιγότερος διαλύτης διότι δεν εξατμίζεται, δεν απαιτείται διαχείριση παραγόμενων τοξικών αέριων, αλλά επιτυγχάνονται υψηλές πιέσεις που φέρουν κινδύνους, υπάρχει περιορισμός στη ποσότητα του δείγματος που μπορεί να εκχυλιστεί, δεν επιτρέπονται πολύ υψηλές τιμές θερμοκρασίας λόγω του υλικού των θαλάμων, δεν επιτρέπεται η προσθήκη δείγματος ή διαλύτη κατά τη διάρκεια της

εκχύλισης και απαιτείται η ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν το άνοιγμα του εκχυλιστήρα. Αντίθετα, στα ανοιχτά δοχεία ατμοσφαιρικής πίεσης υπάρχει μεγαλύτερη ασφάλεια, επιτρέπεται η προσθήκη υλικών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, επιτρέπεται η χρήση θαλάμων διαφόρων υλικών, απομακρύνεται εύκολα ο διαλύτης, μπορούν να εκχυλιστούν μεγάλα δείγματα, δεν χρειάζεται επαναφορά θερμοκρασίας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το κόστος του εξοπλισμού είναι χαμηλό, η διαδικασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και είναι κατάλληλη για θερμοευαίσθητα συστατικά. Όμως, στα συστήματα ανοιχτού τύπου η ακρίβεια είναι χαμηλότερη, η εκχύλιση πολλαπλών δειγμάτων είναι ανέφικτη και ο χρόνος που απαιτείται είναι μεγαλύτερος. (Ekezie et al., 2017, Mandal et al., 2007, Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000)

Εφαρμογές της μεθόδου στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Η εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές επειδή είναι αποτελεσματικότερη και πιο αυτοματοποιημένη μέθοδος εκχύλισης σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Οι Jin et al., 2009 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση μικροκυμάτων από πίτα ελαιοκράμβης. Η πίτα ελαιοκράμβης ήταν απειλωμένη και στο στάδιο της εκχύλισης βρέθηκε βέλτιστη τιμή pH 11,5, ισχύος των μικροκυμάτων 73 W, λόγου στερεού/υγρού 1/28, χρόνου 484 s (~8min) τριών κύκλων εκχύλισης. Για αυτές τις βέλτιστες συνθήκες, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος ήταν ίσο με 83,65% και η απόδοση εκχύλισης ίση με 38,76%.

Οι Ochoa-Rivas et al., 2017 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών από άλευρο αραχίδιας υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Βελτιστοποίησαν τον παράγοντα της ισχύος και του χρόνου, δοκιμάζοντας τιμές ισχύος 145, 290, 435, 580 και 725 W και τιμές χρόνου 2, 4, 6, 8 και 10 min. Για ισχύ 725 W και χρόνο 8 min επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση ίση με 55%, πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων ίση με 93% και αύξηση πρωτεϊνών ίση με 77% σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Επιπλέον, μελέτησαν μερικές ιδιότητες των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων και έφτασαν στο συμπέρασμα ότι η ικανότητα απορρόφησης νερού, η αφριστική ικανότητα, η γαλακτωματοποιητική ικανότητα και η πεπτικότητα των πρωτεϊνών αυξήθηκαν. Κατά την εφαρμογή μικροκυμάτων μεταβλήθηκε η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα αυξήθηκαν κατά 8% οι δομές των β-πτυχωτών φύλλων και κατά 4% οι τυχαίες δομές. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τις τιμές ισχύος και χρόνου που προαναφέρθηκαν, οι Ochoa-Rivas et al. χρησιμοποίησαν νερό ως διαλύτη σε αναλογία στερεού/διαλύτη ίση με 1/25 και 1/10 και επέλεξαν pH εκχύλισης ίσο με 9. (Chemat & Cravotto, 2013, Ochoa-Rivas et al., 2017)

Οι Phongthai et al., 2016 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση μικροκυμάτων από απειλωμένο πίτουρο ρυζιού και τις ιδιότητες των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Βελτιστοποίησαν τον παράγοντα της ισχύος των μικροκυμάτων (600-1000 W), του χρόνου εκχύλισης (60-120 s) και του λόγου στερεού/διαλύτη (0,5-1,5 g πίτουρου/10 mL απεσταγμένου νερού). Για ισχύ 1000 W, χρόνο 90 s και λόγο στερεού/διαλύτη ίσο με 0,89 g πίτουρου/10 mL απεσταγμένου νερού επιτεύχθηκε

πρωτεϊνικό περιεχόμενο ίσο με 71,27% (έναντι του αρχικού πρωτεϊνικού περιεχομένου ίσο με 14,13%), ολική απόδοση διεργασίας ίση με 22,07% και αύξηση της ικανότητας εκχύλισης των πρωτεϊνών κατά 33,18% σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση (30-35 °C, 1 h). Γενικά, η απόδοση εκχύλισης με εφαρμογή μικροκυμάτων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη της αντίστοιχης συμβατικής εκχύλισης και οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών βελτιώθηκαν, ενώ η πεπτικότητα των πρωτεϊνών παρέμεινε ίδια. Με ηλεκτροφόρηση βρέθηκε ότι οι πρωτεϊνικές αλυσίδες έχουν μοριακά βάρη από 17,0 μέχρι 117,0 kDa. Τέλος, να σημειωθεί ότι οι Phonghai et al. επέλεξαν pH εκχύλισης ίσο με 10, pH καταβύθισης ίσο με 4,5 και απεσταγμένο νερό ως διαλύτη.

Οι Choi et al., 2006 μελέτησαν την επίδραση των μικροκυμάτων στην εκχύλιση πρωτεϊνών από άλευρο σόγιας και στη μικροδομή των κυττάρων της σόγιας. Σύγκριναν την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με τη συμβατική εκχύλιση στην οποία χρησιμοποιείται λουτρό με θέρμανση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/στερεού, έως ότου η θερμοκρασία φτάσει τους 60,1 °C και ο λόγος την τιμή 12,6 mL/g. Η απόδοση μειώνεται με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας ή/και του λόγου διαλύτη/στερεού. Επιπλέον, η απόδοση αυξάνεται με αύξηση του χρόνου εκχύλισης για το εύρος των 30 min, ενώ δεν παρατηρείται κάποιος βέλτιστος χρόνος. Στις βέλτιστες συνθήκες, η απόδοση είναι ίση με 24,3%. Επίσης, το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών κυμαίνεται από 19,3 έως 81,3 kDa και καταστρέφεται η μικροδομή των κυττάρων της σόγιας που οδηγεί στην εκρόφιση των πρωτεϊνών προς το εξωτερικό των κυττάρων και ακολούθως στην αύξηση του βαθμού εκχύλισης των πρωτεϊνών.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια διότι είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση και δίνει καλύτερης ποιότητας προϊόντα. Η ακτινοβολία των μικροκυμάτων θερμαίνει το εσωτερικό και το εξωτερικό του δείγματος ταυτόχρονα, χωρίς να δημιουργείται βαθμίδα θερμότητας, όπως στη συμβατική εκχύλιση. Αποτέλεσμα είναι η μείωση του χρόνου εκχύλισης, η μείωση της κατανάλωσης διαλύτη και της απαιτούμενης ενέργειας και η αύξηση του μεγέθους των δειγμάτων που μπορούν να εκχυλιστούν. Έτσι, μειώνεται η εκπομπή CO₂ στην ατμόσφαιρα κάνοντας τη μέθοδο πιο πράσινη από τη συμβατική. Από την άλλη μεριά, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση μη πολικών ή θερμοευαίσθητων συστατικών. Τέλος, δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες πάνω στην εκχύλιση με μικροκύματα σε βιομηχανικό επίπεδο.

Ο συνδυασμός της εκχύλισης με μικροκύματα και με άλλη τεχνική ή με κάποιον εναλλακτικό διαλύτη μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την απόδοση της διεργασίας και να εξασφαλίσει τη φιλικότητα της μεθόδου προς το περιβάλλον. Για παράδειγμα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και ένζυμα οδηγεί σε αυξημένη εκλεκτικότητα και απόδοση, αφού διευκολύνεται η απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Ταυτόχρονα, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανάκτηση πολλαπλών

συστατικών. Είναι σημαντικό να γίνει βελτιστοποίηση των συνδυασμένων μεθόδων για τον έλεγχο των παραμέτρων της εκχύλισης, την αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, την ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας και επακολούθως τη χρήση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων σε βιομηχανικό επίπεδο. (Ekezie et al., 2017, Gharib-Bibalan, 2018, Spar Eskilsson & Bjorklund, 2000)

2.3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (Enzyme assisted extraction, EAE)

Μηχανισμός Δράσης Ενζύμων κατά την Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Κάποιες πρωτεΐνες των φυτών βρίσκονται διεσπαρμένες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ κάποιες άλλες συγκεντρώνονται σε σύμπλοκα. Παράδειγμα αποτελούν τα σύμπλοκα λιγνίνης-πολυσακχαριτών στα οποία οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται με υδρόφοβους δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου. Έτσι δυσχεραίνεται η εκχύλιση τους, αφού δεν έρχονται σε επαφή με τον διαλύτη. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης δεν δίνουν τη δυνατότητα στον διαλύτη να εισχωρήσει επαρκώς στη μήτρα του φυτού. (Azmir et al., 2013)

Ένας γενικός περιορισμός της ανάκτησης πρωτεϊνών από φυτικές πρώτες ύλες προκύπτει και λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους. Η χαμηλή διαλυτότητα των πρωτεϊνών ενισχύεται από τη μετουσίωσή τους που συμβαίνει κατά τις θερμικές διεργασίες, όπως η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες με χρήση διαλύτη. Λόγω της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί διεργασίες υποβοηθούμενες από ένζυμα που στοχεύουν στη λιγνοκυτταρινική βιομάζα και στα πρωτεϊνούχα υλικά. Έτσι, ένζυμα που υδρολύουν υδατάνθρακες και πρωτεΐνες σε ουδέτερες ή ήπιες όξινες/αλκαλικές συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, με τη χρήση ενζύμων διευκολύνεται η εκχύλιση πρωτεϊνών από τις φυτικές πρώτες ύλες. Να σημειωθεί ότι τα ένζυμα μπορεί να προέρχονται από μύκητες, βακτήρια, όργανα ζώων ή εκχυλίσματα φρούτων/λαχανικών. (Contreras et al., 2019, Gharib-Bibalan, 2018)

Η εφαρμογή των ενζύμων αφορά την αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιούνται οι πρωτεάσες που έχουν ως τελικό στόχο την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, αποδομούν τις πρωτεΐνες διασπώντας τους πεπτιδικούς δεσμούς και οδηγούν σε ένα πεπτιδικό μείγμα διαφορετικού μοριακού βάρους και ελεύθερο αμινοξέων. Μία άλλη εφαρμογή των ενζύμων κατά την εκχύλιση πρωτεϊνών βασίζεται στην καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η δράση συγκεκριμένων ενζύμων καταλύει τη διάσπαση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης ή/και της πηκτίνης, που είναι τα κύρια συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και των κυτταρικών ιστών. Τα ένζυμα αυτά, που ονομάζονται κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και πηκτινάσες αντίστοιχα, αυξάνουν την απόδοση εκχύλισης μέσω της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών από τη μήτρα του φυτικού κυττάρου. Για παράδειγμα η ξυλανάση, που είναι ημικυτταρινάση, υδρολύει τη ξυλάνη, έναν από τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, διασπώντας την σε μικρότερης αλυσίδας ολισακχαρίτες. Έτσι οι μοριακοί δεσμοί της μήτρας διασπώνται απελευθερώνοντας πρωτεΐνες. (Gençdağ et al., 2020, Rojić et al., 2018)

Παράγοντες που επηρεάζουν την Εκχύλιση

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα εξαρτάται από το είδος της φυτικής πρώτης ύλης και το είδος του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Στον πίνακα 2.2. παρουσιάζεται μία σύγκριση των συνηθέστερων ενζύμων που χρησιμοποιούνται για εκχύλιση, με βάση τις αποδόσεις εκχύλισης από διάφορες φυτικές πρώτες ύλες. Γίνεται φανερό ότι η δράση κάθε ενζύμου εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης και το εκχυλιζόμενο συστατικό. Πιο συγκεκριμένα, παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση είναι η σύνθεση και η συγκέντρωση του ενζύμου, το μέγεθος των μορίων του φυτού και το ποσοστό υγρασίας του. Επιπλέον, διαφορετικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση διαφορετικών συστατικών από την ίδια πρώτη ύλη. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Liu et al., 2016 (a), Pojić et al., 2018)

Πίνακας 2.2. Σύγκριση αποδόσεων εκχύλισης με χρήση ενζύμων από διάφορες πρώτες ύλες

Προέλευση: Gençdağ et al., 2020 μετά από προσαρμογή

Πρώτη ύλη	Απόδοση εκχύλισης
Άλευρο σησαμιού	Alcalase > Protamex > Neutrased > Flavourzyme
Σπόρος σησαμιού	Viscozyme L > Alcalase > Protamex
Λιναρόσπορος	Viscozyme L > Alcalase > Flavourzyme > Neutrased
Σόγια	Protex 5L > Protex P > Protex 40XL
Σόγια	IndiAge Super L > Puradax HA > Multifect B > Multifect pectinase
Ηλιόσπορος	Kemzyme > Natuzyme > Alcalase 2.4L > Viscozyme L > Protex 7L
Αραχίδα	Alcalase > Papain > Protamex
Παραπροϊόν φύλλων τσαγιού	Alcalase > Protamex > Neutrased > Flavourzyme

Η απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενης από ένζυμα εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Η βέλτιστη τιμή pH ποικίλει αναλόγως του ενζύμου και επηρεάζει τη δράση του ενζύμου αλλά και τον διαχωρισμό ελαίου και πρωτεϊνών. Τα περισσότερα ένζυμα απαιτούν ουδέτερες τιμές pH 6-8. Επιπλέον, απαιτούν μέτριες τιμές θερμοκρασίας 40-60 °C, ώστε να μην απενεργοποιηθούν, αλλά και να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις των εκχυλιζόμενων πρωτεϊνών, όπως η μετουσίωση. Για αυτόν τον λόγο πρέπει να ληφθεί υπόψη εκτός από το είδος της πρώτης ύλης και το είδος του ενζύμου, και η ποιότητα των τελικών πρωτεϊνών για τη βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας. Ωστόσο, χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε χαμηλούς ρυθμούς δράσης των ενζύμων και κατά συνέπεια σε χαμηλούς ρυθμούς εκχύλισης των πρωτεϊνών. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση εκχύλισης υποβοηθούμενης από ένζυμα είναι ο λόγος διαλύτη/στερεού. Όσο αυξάνεται ο λόγος διαλύτη/στερεού, τόσο αυξάνεται η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών και η τελική περιεκτικότητα του πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος σε πρωτεΐνες. Όμως, υψηλός λόγος διαλύτη/στερεού σημαίνει μεγάλο κόστος διαλύτη, οπότε αναγκαία είναι η βελτιστοποίηση του λόγου. Αναγκαία είναι και η βελτιστοποίηση του χρόνου

εκχύλισης και αυτό διότι μικρός χρόνος εκχύλισης σημαίνει χαμηλή απόδοση της υδρόλυσης των ενζύμων και κατά συνέπεια μη επαρκή διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, ενώ μεγάλος χρόνος εκχύλισης σημαίνει μείωση της ποιότητας των τελικών πρωτεϊνών. Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης, όπως και οι άλλοι παράγοντες, εξαρτώνται από το είδος του χρησιμοποιούμενου ενζύμου και από το είδος της φυτικής πρώτης ύλης. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Liu et al., 2016 (a))

Εφαρμογές της μεθόδου στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Όσον αφορά τη μελέτη της εκχύλισης πρωτεϊνών με χρήση ενζύμων, οι Rommi et al., 2014 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών από αποφλοιωμένη και μη πίτα ελαιοκράμβης, που περιείχε 36-40% πρωτεΐνες και 35% υδατάνθρακες. Έγινε προκατεργασία της πρώτης ύλης με πηκτινάση (Pectinex Ultra SP-L), ξυλανάση (Depol 740L) και κυτταρινάση (Celluclast 1.5L). Η προκατεργασία με τα ένζυμα έδειξε αύξηση της απόδοσης εκχύλισης πρωτεϊνών, όμως τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έδειξε η πηκτινάση Pectinex. Η προκατεργασία με πηκτινάση συγκέντρωσης 10 mg πρωτεΐνης/g ξηρής πρώτης ύλης έγινε στους 30 °C, σε pH ίσο με 6, για 48 h, σε όγκο 25 mL με 10% w/v απιονισμένο νερό, που περιείχε 0,2% w/v νατραζίδιο ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Έπειτα έγινε διαχωρισμός του στερεού από το υγρό με φυγοκέντρηση 15 min, το υγρό διατηρήθηκε στους -20 °C και το στερεό συλλέχθηκε για περαιτέρω επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών υπολογίστηκε μέσω των μη εκχυλισμένων πρωτεϊνών του στερεού υπολείμματος. Η χρήση πηκτινάσης προκάλεσε αποτελεσματική διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω της υδρόλυσης της πηκτίνης και της γλυκάνης και αύξησε την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών κατά 1,7 φορές, σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση χωρίς την ενζυμική προκατεργασία. Το ποσοστό των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκε είναι 74% και 56% στην αποφλοιωμένη και μη πίτα ελαιοκράμβης, αντίστοιχα, ενώ το τελικό ποσοστό πρωτεϊνών είναι 31,4% και 32,3%, αντίστοιχα. Η ανάλυση με οπτική μικροσκοπία έδειξε ότι μόρια πηκτίνης και πρωτεϊνών συνυπάρχουν στα εμβρυικά κύτταρα της πίτας ελαιοκράμβης. Η υδρόλυση αυτών των ενδοκυτταρικών μορίων πηκτίνης και η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διεργασία με πηκτινάση ενίσχυσαν την απελευθέρωση των πρωτεϊνών.

Σε επιπρόσθετη μελέτη τους, οι Rommi et al., 2015 εξέτασαν την υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα χωρίς ρύθμιση του pH, σε σχέση με την αλκαλική εκχύλιση ακολουθούμενη από ισοηλεκτρική καταβύθιση που χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη. Πιο συγκεκριμένα για την ανάκτηση πρωτεϊνών από απελαιωμένη πίτα ελαιοκράμβης που περιέχει 39% πρωτεΐνες, εφαρμόστηκε προκατεργασία με πηκτινάση, η οποία είχε βρεθεί προηγουμένως ως το πιο αποτελεσματικό ένζυμο για τη συγκεκριμένη πρώτη ύλη. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση του pH εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τελικών πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων ήταν εφικτή σε υψηλό περιεχόμενο στερεών (40%) και αύξησε την ανάκτηση των πρωτεϊνών σε σχέση με την αλκαλική εκχύλιση ακολουθούμενη από ισοηλεκτρική καταβύθιση, στην οποία

παρουσιάστηκε μερική μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων πραγματοποιήθηκε σε pH ίσο με 6 και μείωσε το μέγεθος των μορίων των πρωτεϊνών, αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους, το ζ-δυναμικό τους και την ικανότητά τους να διασπείρονται στο υγρό μέσο. Με σύγκριση του βαθμού ανάκτησης των πρωτεϊνών από την υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (σε pH 6) και τη συμβατική αλκαλική εκχύλιση (σε pH 10), γίνεται αντιληπτό ότι μετά την ενζυμική προκατεργασία οι πρωτεΐνες μπορούν να εκχυλιστούν και χωρίς τη χρήση αλκαλικού διαλύτη. Ωστόσο, η ενζυμική εκχύλιση είναι εφικτή μόνο για χαμηλό ποσοστό στερεών (10%), ενώ για μεγαλύτερο ποσοστό στερεών (20%) η αλκαλική εκχύλιση είναι πιο αποτελεσματική. Τέλος, η ενζυμική προκατεργασία της απελαιωμένης πίτας ελαιοκράμβης για 2 h με περιεχόμενο στερεών 40% ακολουθούμενη από αλκαλική εκχύλιση για 1 h με περιεχόμενο στερεών 10% έδωσε τη μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών ίση με 53% των ολικών αρχικών πρωτεϊνών και ποσοστό του τελικού συμπυκνώματος σε πρωτεΐνες είναι ίσο με 57,3%.

Οι Niu et al., 2012 μελέτησαν την ενζυμική υδατική εκχύλιση πρωτεϊνών και υπολειπόμενου ελαίου από πίτα ελαιοκράμβης που έχει υποστεί απελαίωση, αποφλοίωση και ψυχρή έκθλιψη. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν είναι ένα μείγμα κυτταρινασών Viscozyme L και αλκαλάσης Alcalase 2.4L (1:1 w/w), ανάμεσα στην αλκαλάση Alcalase 2.4L (βέλτιστο pH 8,0), στην πρωτεάση Neutrase (βέλτιστο pH 6,0), στην κυτταρινάση Viscozyme L (βέλτιστο pH 4,5) και στην πηκτινάση Pectinex (βέλτιστο pH 4,5). Πιο συγκεκριμένα κατά την ενζυμική κατεργασία, η πίτα ελαιοκράμβης διαλύεται σε νερό σε αναλογία νερού/στερεού ίση με 5:1 w/w και το pH ρυθμίζεται στη βέλτιστη τιμή pH του ενζύμου που πρόκειται να προστεθεί. Το ένζυμο ή το μείγμα ενζύμων προστίθεται σε αναλογία 2,0% της συνολικής πίτας (w/w) και η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε 150 rpm για 2 h. Τα αποτελέσματα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι κατά την ψυχρή έκθλιψη της ελαιοκράμβης η δομή των κυττάρων καταστράφηκε μερικώς, ενώ η αποφλοίωση δεν επηρέασε σημαντικά τη δομή τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των ενζύμων, του χρόνου επεξεργασίας και του λόγου διαλύτη/στερεού στην απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών και ελαίου. Ο λόγος διαλύτη/στερεού επηρέασε σημαντικά την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών και του ελαίου, ενώ ο χρόνος εκχύλισης επηρέασε σημαντικά μόνο την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών. Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν είναι συγκέντρωση ενζύμων 1,0% (Viscozyme L και Alcalase 2.4L), λόγος διαλύτη/στερεού 6:1 και χρόνος εκχύλισης 80 min. Υπό αυτές τις συνθήκες προέκυψε απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών ίση με 82,10% και ελαίου ίση με 71,89%, αντίστοιχα.

Οι Sari et al., 2013 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα από πίτα ελαιοκράμβης, σόγιας και μικροφυκιού. Η εκχύλιση έγινε υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και είδους ενζύμου. Κατά την εκχύλιση υπό αλκαλικές συνθήκες εκχυλίστηκαν περισσότερες πρωτεΐνες σε σχέση με την εκχύλιση υπό όξινες συνθήκες. Σε αλκαλικό pH εκχυλίστηκαν 80% των συνολικών πρωτεϊνών της πίτας σόγιας και 15-30% της ελαιοκράμβης και του μικροφυκιού. Αντίθετα, με χρήση

ενζύμων στις ίδιες συνθήκες εκχύλισης εκχυλίστηκαν 90% των συνολικών πρωτεϊνών της πίτας σόγιας και 50-80% της ελαιοκράμβης και του μικροφυκιού. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ελαιοκράμβη ήταν σερινοπρωτεάση, ενδο-πρωτεάσες και εξω-πρωτεάσες και πιο συγκεκριμένα τα Protex 40XL, Protex P και Protex 5L, που λειτουργούν σε αλκαλικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, στην ελαιοκράμβη έγινε προσθήκη ενδο-πρωτεασών (5% w/w) και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε pH ίσο με 10-11, θερμοκρασία 60 °C για χρόνο 3 h. Η μη απειαιωμένη πίτα μικροφυκιού που επίσης μελετήθηκε, έδειξε τη μικρότερη απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών το οποίο δείχνει ότι η απομάκρυνση ελαίου βοηθά την εκχύλιση των πρωτεϊνών. Όσον αφορά τη σόγια, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα δεν αύξησε σε μεγάλο βαθμό την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών σε σχέση με τη συμβατική αλκαλική εκχύλιση. Δηλαδή με χρήση ενζύμων η απόδοση εκχύλισης από σόγια αυξήθηκε από 80% σε μόλις 90%.

Οι Fetzer et al., 2018 μελέτησαν την επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών από συμπιεσμένη πίτα ελαιοκράμβης που έχει προέλθει από ψυχρή ή μη έκθλιψη. Κύριος σκοπός της μελέτης ήταν η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης για τη μέγιστη τιμή απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο λόγος στερεού/διαλύτη, ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, η τιμή του pH, η συγκέντρωση του NaCl, ο αριθμός των κύκλων εκχύλισης και η επεξεργασία με το ένζυμο πρωτεάση. Χωρίς την επεξεργασία με πρωτεάση, οι μέγιστες αποδόσεις εκχύλισης πρωτεϊνών που προέκυψαν ήταν 52,3% και 36,7% για την πίτα ελαιοκράμβης που έχει προέλθει από ψυχρή ή μη έκθλιψη, αντίστοιχα. Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση, ο πιο σημαντικός φάνηκε να είναι η συγκέντρωση του NaCl. Όσον αφορά την τιμή του pH, η εκχύλιση σε τιμές pH 5,7-5,8 έδωσε παρόμοιες αποδόσεις με την εκχύλιση σε τιμές pH 7-9. Ωστόσο, αυξημένη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε σε πολύ αλκαλικές συνθήκες (pH 11-12) και με την προεπεξεργασία με πρωτεάση Protease A-01 (1% w/w πρωτεΐνης, pH 9 και 50 °C), υπό τον περιορισμό της υδρόλυσης των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες συνθήκες. Οι μέγιστες αποδόσεις ενζυμικής εκχύλισης πρωτεϊνών που προέκυψαν ήταν 59,5% και 60,6% για ένα κύκλο εκχύλισης (pH 9) για την πίτα ελαιοκράμβης που έχει προέλθει από ψυχρή ή μη έκθλιψη, αντίστοιχα και 80,7% και 78,3% για τρεις κύκλους εκχύλισης (pH 5,8/5,7-9-12) για την πίτα ελαιοκράμβης που έχει προέλθει από ψυχρή ή μη έκθλιψη, αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι κάθε στάδιο εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε λόγο στερεού/διαλύτη ίσο με 1/11, σε θερμοκρασία 20 °C, για χρόνο 60 min, με προσθήκη 0,25 M NaCl, που αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που βρέθηκαν.

Γενικά για την ανάκτηση πρωτεϊνών, οι μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης έχουν παρατηρηθεί στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα και ιδίως με πρωτεάσες. Οι αποδόσεις ενζυμικής εκχύλισης πρωτεϊνών έχει βρεθεί να ξεπερνούν το 80% (Niu et al. 2012, Fetzer et al. 2018). Μεγάλη σημασία πρέπει να δοθεί στον τύπο του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί, αλλά και στις υπόλοιπες συνθήκες εκχύλισης, αναλόγως της

φύσης της πρώτης ύλης και της προεπεξεργασίας που έχει υποστεί. (Contreras et al., 2019, Fetzter et al., 2018)

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα φέρει πολλά πλεονεκτήματα. Αποτελεί μία πράσινη μέθοδο εκχύλισης διότι δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών π.χ. εξανίου, όπως απαιτούν η αλκαλική και όξινη συμβατική εκχύλιση. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στην ενζυμική εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών π.χ. πρωτεϊνών και ελαίου είναι συνήθως το νερό. Επιπλέον, με εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα προκύπτουν υψηλές αποδόσεις εκχύλισης πρωτεϊνών και υψηλή ποιότητα των τελικών πρωτεϊνικών προϊόντων, χωρίς να υπάρξει παραγωγή βλαβερών παραπροϊόντων. Το προϊόν πρωτεϊνών έχει χαμηλό ιξώδες, θερμική σταθερότητα, υψηλή διαλυτότητα και αντίσταση στους οξειδωτικούς παράγοντες και για αυτόν τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι ιδιότητες αυτές προκύπτουν λόγω της χρήσης ήπιων συνθηκών εκχύλισης (τιμές pH 6-8 και θερμοκρασίες 40-60 °C), οπότε δεν προκαλούνται ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα είναι η πιο προτιμητέα για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα, λόγω των υψηλών αποδόσεων που πετυχαίνει. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Liu et al., 2016 (a), Rojić et al., 2018)

Από την άλλη μεριά, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα χαρακτηρίζεται από υψηλούς χρόνους διεργασίας, υψηλή κατανάλωση ενέργειας, μη αντιστρεπτή διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και ανάγκη για προσεκτική ρύθμιση των παραμέτρων εκχύλισης, όπως η θερμοκρασία και το pH. Για εφαρμογή των ενζύμων σε βιομηχανική κλίμακα πρέπει να μελετηθεί η δράση τους, οι καταλυτικές ιδιότητές τους, η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης και η καταλληλότητά τους για κάθε πρώτη ύλη. Μειονέκτημα της εκχύλισης υποβοηθούμενης από ένζυμα αποτελεί και το κόστος του ενζύμου. Μόνο αν το ένζυμο είναι εμπορικά διαθέσιμο σε λογική τιμή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπλέον, η συλλογή των τελικών πρωτεϊνών με καταβύθιση μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες στον διαχωρισμό των μορίων μικρού μοριακού βάρους. Έτσι, μπορεί να είναι αναγκαίο ένα στάδιο υπερδιήθησης για διαχωρισμό των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους του πρωτεϊνικού προϊόντος μετά την κατεργασία με ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο, δεν θα είναι αναγκαία και η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου, αφού αυτό θα απομακρυνθεί κατά την υπερδιήθηση. (Contreras et al., 2019, Fetzter et al., 2018, Gençdağ et al., 2020, Gharib-Bibalan, 2018)

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης των προβλημάτων που προκύπτουν κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα είναι η χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα και μικροκύματα αποτελεί μία μέθοδο με μεγάλες δυνατότητες, διότι η ενέργεια που παρέχεται από τη μη ιονίζουσα μικροκυματική ακτινοβολία επιτρέπει την περιστροφή των διπόλων των μορίων και προκαλεί την καταστροφή των κυττάρων, ενώ παρέχεται συνεχώς θερμότητα. (Ekezie et al., 2017)

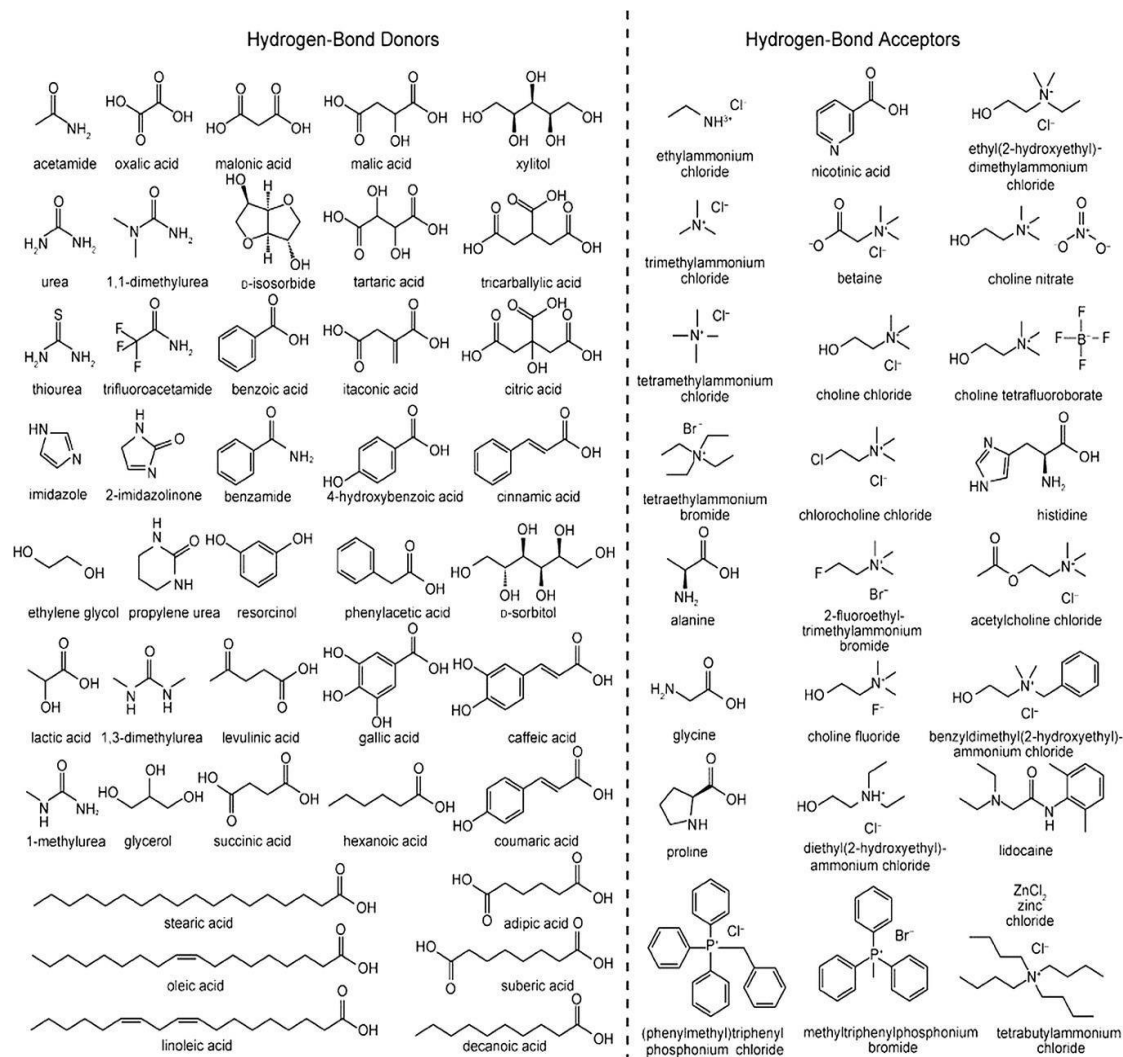
2.3.3 Εκχύλιση με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DES)

Γενικά

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί η χρήση των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, ώστε να αντικατασταθούν οι τοξικοί συμβατικοί διαλύτες. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως μη πτητικότητα, χαμηλή τάση ατμών, υψηλή θερμική σταθερότητα, θερμική αγωγιμότητα, διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα και πρόκειται για πράσινους, μη εύφλεκτους διαλύτες, φιλικούς προς το περιβάλλον. Γενικά παράγονται από δύο ή τρία στερεά συστατικά τα οποία αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου για δημιουργία ενός υγρού με χαμηλότερο σημείο τήξεως σε σχέση με τα αρχικά συστατικά. Επιπλέον, οι συγκεκριμένοι διαλύτες δίνουν και δέχονται ηλεκτρόνια και με αυτόν τον τρόπο διαλύουν πιο εύκολα τα εκχυλιζόμενα συστατικά σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες. Εκτός από την εκχύλιση, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε οργανικές αντιδράσεις, σε ενζυμικές αντιδράσεις στους 60 °C, στην ηλεκτροχημεία, τη φαρμακευτική και τη νανοτεχνολογία. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση ή διαχωρισμό βιοντίξελ, αρωματικών υδρογονανθράκων, αερίων και βιοδραστικών συστατικών. (Dai et al., 2013, Ekezie et al., 2017, Gençdağ et al., 2020)

Παρασκευή και Ιδιότητες των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DES) εισήχθησαν ως έννοια τις τελευταίες δεκαετίες και ορίστηκαν ως ένα μείγμα δύο ή περισσότερων οξέων και βάσεων κατά Lewis ή οξέων και βάσεων κατά Brønsted-Lowry. Το μείγμα αυτό έχει πολύ χαμηλότερο σημείο τήξεως σε σχέση με τα αρχικά συστατικά από τα οποία αποτελείται, λόγω της δημιουργίας διαμοριακών δεσμών υδρογόνου. Γενικά, οι DES αποτελούνται από μία συγκεκριμένη αναλογία ενός δέκτη και ενός δότη δεσμού υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, ως δέκτες δεσμού υδρογόνου μπορούν να λειτουργήσουν τα τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, όπως το χλωρίδιο της χολίνης (ChCl). Το ChCl αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα και χρησιμοποιείται ευρέως για παρασκευή ευτηκτικών διαλυτών. Οι DES που παρασκευάζονται από ChCl έχουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως εξαιρετική θερμική και χημική σταθερότητα, υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και χαμηλή τοξικότητα. Ως δότες δεσμού υδρογόνου λειτουργούν τα αμίδια, οι αλκοόλες, τα καρβοξυλικά οξέα, οι πολυόλες, η ουρία κλπ. Κάποιοι δέκτες και δότες δεσμού υδρογόνου παρατίθενται στο σχήμα 2.2. Όπως προαναφέρθηκε, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια των συστατικών και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μία συγκεκριμένη πολικότητα στο μείγμα που δίνει τη δυνατότητα εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών, όπως οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή, οι πρωτεΐνες και τα οξέα.



Σχήμα 2.2. Κάποιοι δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παρασκευή των DES

Πηγή: Tang et al., 2015

Προσφάτως έχει μελετηθεί η δημιουργία των DES από πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών και βιο-ανανεώσιμα υλικά. Αυτοί οι διαλύτες ονομάζονται φυσικοί βαθέως ευηλεκτρικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents- NADES) και προκύπτουν από την ανάμειξη στερεών πρωτογενών μεταβολιτών των φυτών σε συγκεκριμένη αναλογία, σε αντίθεση με τους ευηλεκτρικούς διαλύτες που προέρχονται και από συνθετικά υλικά. Οι NADES μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: ιοντικά υγρά με ένα οξύ και μία βάση, NADES βασισμένοι σε σάκχαρα με μονάχα ουδέτερα συστατικά, NADES βασισμένοι σε σάκχαρα με βάσεις και NADES βασισμένοι σε σάκχαρα με οξέα. Παρά το υψηλό ιξώδες τους, οι NADES είναι υγροί σε θερμοκρασία δωματίου, ακόμα και σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Η προσθήκη μικρής ποσότητας νερού μειώνει σημαντικά το υψηλό ιξώδες τους, ενώ διατηρούν τα χαρακτηριστικά τους. Ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι ότι διαλύουν μακρομόρια, όπως DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες και γενικά μεταβολίτες που διαλύονται λίγο ή καθόλου στο νερό. Η υψηλή διαλυτότητα των NADES σχετίζεται με

το μεγάλο εύρος της πολικότητάς τους και την υπερμοριακή δομή τους. Να σημειωθεί ότι οι NADES παίζουν σημαντικό ρόλο ως διαλύτες, εναλλακτικοί του νερού, στους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτό εξηγείται από τη δυνατότητα βιοσύνθεσης, διάλυσης, μεταφοράς και αποθήκευσης μη υδατοδιαλυτών μεταβολιτών και μακρομορίων στα κύτταρα. Από αυτό το γεγονός γίνεται αντιληπτή η σημαντικότητα των NADES και η μεγάλη ικανότητα διάλυσης που παρέχουν. Γενικά τα φυτικά συστατικά χαρακτηρίζονται από χημική ποικιλότητα, βιοδιαθεσιμότητα και φαρμακευτικά αποδεκτό προφίλ τοξικότητας και για αυτόν τον λόγο είναι ιδανικά για την παρασκευή ευτηκτικών διαλυτών. Συμπερασματικά, οι NADES έχουν δείξει μεγάλο ενδιαφέρον σε διεργασίες εκχύλισης, επειδή αποτελούν μη τοξικούς, πράσινους διαλύτες. Να επισημανθεί ότι έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 100 NADES. (Contreras et al., 2019, Dai et al., 2013, Ekezie et al., 2017, Gençdağ et al., 2020, Pojić et al., 2018, Zainal-Abidin et al., 2017)

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES, όπως το σημείο τήξεως, η πυκνότητα, η αγωγιμότητα και το ιζώδες, εξαρτώνται από τη δομή τους. Το σημείο τήξεως, το οποίο είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με τα αρχικά συστατικά, εξαρτάται από την αναλογία του δότη δεσμού υδρογόνου στον DES. Αυτό συμβαίνει λόγω των αυξημένων δεσμών υδρογόνου με ανιονικές ομάδες που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των αλληλεπιδράσεων με κατιονικές ομάδες. Αυτή η ασθενής αλληλεπίδραση μεταξύ ανιονικών και κατιονικών ομάδων, οδηγεί σε μείωση του σημείου τήξεως.

Το είδος του δότη δεσμού υδρογόνου, το είδος του άλατος και η αναλογία mol τους επηρεάζουν την πυκνότητα, την επιφανειακή τάση και το ιζώδες των DES. Γενικά, οι DES εμφανίζουν αυξημένο ιζώδες και μειωμένη αγωγιμότητα σε σχέση με άλλους διαλύτες. Το αυξημένο ιζώδες των DES προέρχεται κυρίως λόγω του εκτενούς δικτύου που αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου και περιορίζει την κινητικότητα των μορίων μέσα του. Το ιζώδες των DES, όπως και η επιφανειακή τάση τους, είναι αντιστρόφως ανάλογη της θερμοκρασίας, ενώ η ιοντική αγωγιμότητα είναι ανάλογη της θερμοκρασίας. Να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι DES έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό. (Zainal-Abidin et al., 2017)

Οι DES μπορούν να παρασκευαστούν με ανάμειξη του δέκτη και του δότη δεσμού υδρογόνου σε κατάλληλη θερμοκρασία. Αρχικά, τήκεται το στερεό συστατικό με το μικρότερο σημείο τήξεως και έπειτα προστίθεται το στερεό συστατικό με το μεγαλύτερο σημείο τήξεως και τήκονται μαζί (Tang et al., 2015). Αν και τα δύο συστατικά έχουν υψηλό σημείο τήξεως, τότε αναμειγνύονται και τήκονται μαζί κατευθείαν. Οι Dai et al., 2013 επισήμαναν ότι οι DES μπορούν να παρασκευαστούν με δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος είναι η ζήρανση υπό κατάψυξη και η δεύτερη μέθοδος είναι η θέρμανση του μείγματος των στερεών συστατικών στους 80 °C. Πιο συγκεκριμένα, μελέτησαν την παρασκευή των NADES με θέρμανση στους 50 °C υπό ανάδευση για 0,5-2 h, λόγω της προσθήκης μικρής ποσότητας νερού. Η μέθοδος αυτή αποτέλεσε μία φθηνότερη και ασφαλέστερη εναλλακτική, δεδομένου ότι κάποια συστατικά είναι θερμοευαίσθητα π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα. Όσον αφορά τους NADES, τα συστατικά που τους αποτελούν, δηλαδή οι πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών,

αλλάζουν την κατάστασή τους από στερεή σε υγρή όταν αναμειχθούν σε συγκεκριμένη αναλογία.

Εφαρμογές των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Οι Grudniewska et al., 2018 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση του ευτηκτικού διαλύτη ChCl-γλυκερόλη από πίτα ελαιοκράμβης και πίτα νυχτολούλουδου. Για την παρασκευή του ευτηκτικού ChCl-γλυκερόλη, τα συστατικά αναμείχθηκαν σε αναλογία mol 1:2. Το μείγμα αναδεύτηκε για 45 min, σε θερμοκρασία 80 °C, σε 500 rpm μέχρι ομογενοποίησης και δημιουργίας ενός διαφανούς υγρού. Έπειτα, ο DES αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Έγινε άλεση της πρώτης ύλης και ανάμειξη 5 g αυτής με 45 g DES (αναλογία 1:9 w/w). Το μείγμα εκχυλίστηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 60, 100 και 140 °C για 2 h. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα συλλέχθηκαν με προσθήκη νερού (antisolvent) στο εκχύλισμα που προήλθε με χρήση DES. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας και έφτασε μέχρι 20% στην πίτα ελαιοκράμβης και 35% στην πίτα νυχτολούλουδου για θερμοκρασία 140 °C. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των προϊόντων της ελαιοκράμβης ήταν ίσο με 36-48% και του νυχτολούλουδου ήταν 40-50%, δηλαδή 20% περισσότερο από την αρχική πρώτη ύλη. Μέσω ηλεκτροφόρησης έγινε κατανοητό ότι ο DES ChCl-γλυκερόλη εκχύλισε εκλεκτικά από την πίτα ελαιοκράμβης την κυριότερη αποθηκευτική πρωτεΐνη της. Οι Grudniewska et al. κατέληξαν στο ότι οι πρωτεΐνες που προέρχονται από πίτα ελαιοκράμβης με εκχύλιση σε θερμοκρασία 60 και 100 °C μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων λόγω του ανοιχτού χρώματός τους. Επίσης, έφτασαν στο συμπέρασμα ότι οι DES μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν, το οποίο δημιουργεί δυνατότητες για χρήση των DES σε βιομηχανική κλίμακα.

Οι Liu et al., 2016 (b) μελέτησαν DES βασισμένους στην πολυ-αιθυλενογλυκόλη (PEG 200) για εκχύλιση πρωτεϊνών από σπόρους κολοκύθας. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους και μικροκύματα αριστοποιήθηκε μέσω της βελτιστοποίησης του λόγου στερεού/διαλύτη, της ισχύος των μικροκυμάτων, της θερμοκρασίας εκχύλισης και της συγκέντρωσης του DES. Ανάμεσα στους διάφορους διαλύτες, μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης έδωσε ο ευτηκτικός διαλύτης που αποτελείται από τον δότη δεσμού υδρογόνου PEG 200 και τον δέκτη δεσμού υδρογόνου ChCl (σε αναλογία mol 3:1) σε συγκέντρωση 28% w/w. Να σημειωθεί ότι η παρασκευή του διαλύτη έγινε με ανάμειξη των συστατικών του σε θερμοκρασία 90 °C, για 3 h, με ανάδευση μέχρι δημιουργίας ενός ομογενοποιημένου υγρού. Επιπλέον, για λόγο στερεού/διαλύτη 28 g/mL, ισχύ 140 W και θερμοκρασία 43 °C προέκυψε μέγιστη απόδοση εκχύλισης 93,95% από την απειαιωμένη πρώτη ύλη. Η απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών προέκυψε ίση με 97,97% για χρόνο καταβύθισης μόλις 4 min μέσω μίας μεθόδου συγκαταβύθισης στο ισοηλεκτρικό σημείο μείγματος αιθανόλης-PEG 200 DES. Γενικά, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, μικροκύματα και DES αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο γρήγορης και αποτελεσματικής εκχύλισης πρωτεϊνών από σπόρους κολοκύθας, αλλά και άλλους ελαιούχους σπόρους.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

Ένα μειονέκτημα των DES είναι το υψηλό ιξώδες τους. Το υψηλό ιξώδες παρεμποδίζει τη μεταφορά μάζας των εκχυλιζόμενων συστατικών από τη μήτρα του φυτού στον διαλύτη. Επιπλέον, παρεμποδίζει τα στάδια της απόχυσης, της διάλυσης και της διήθησης. Για την παρασκευή του DES, εκτός από τη εύρεση των κατάλληλων συστατικών και την κατάλληλη αναλογία τους, η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού μπορεί να μειώσει δραστικά το ιξώδες του. Έχει βρεθεί ότι στον διαλύτη CHCl_3 -γλυκερόλη (1:1) το ιξώδες μειώνεται κατά 1/5 με προσθήκη 5% νερού και μειώνεται στο 1/80 της αρχικής τιμής ιξώδους με προσθήκη 20% νερού. Από την άλλη, η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων νερού μπορεί να προκαλέσει μειωμένη αλληλεπίδραση μέσω δεσμών υδρογόνου, μεταξύ των συστατικών του DES. Έχει βρεθεί ότι προσθήκη 50% νερού παρεμποδίζει ολοκληρωτικά τις αλληλεπιδράσεις. Η προσθήκη νερού μπορεί να γίνει κατά την παρασκευή του DES ή και αργότερα. Αυτό επηρεάζει τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητές του. Οι ιδιότητες των DES, όπως το ιξώδες και η τάση ατμών, θα πρέπει να μελετηθούν ιδιαίτερος για τη χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο.

Οι DES μπορούν να συνδυαστούν με μικροκύματα ή υπέρηχους, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών στον διαλύτη και ακολούθως αύξηση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών. Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και DES, οι DES απορροφούν τη μικροκυματική ακτινοβολία και διαρρηγνύουν τα κυτταρικά τοιχώματα, απελευθερώνοντας τα εκχυλιζόμενα συστατικά από τη μήτρα του φυτού. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, μειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης και η κατανάλωση του διαλύτη. (Contreras et al., 2019, Ekezie et al., 2017, Gençdağ et al., 2020, Zainal-Abidin et al., 2017)

2.3.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους (Ultrasound assisted extraction, UAE)

Γενικά

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των υπερήχων αποτελεί μία αξιόπιστη τεχνική στη βιομηχανία τροφίμων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας, όπως είναι η ομογενοποίηση, η εκχύλιση, η γαλακτωματοποίηση, η κρυσταλλοποίηση, η παστερίωση, η αφυδάτωση και η απενεργοποίηση μικροοργανισμών και ενζύμων. Μεγάλο ενδιαφέρον έχει η χρήση των υπερήχων στην εκχύλιση βιομορίων, λόγω της μείωσης του απαιτούμενου χρόνου της εκχύλισης σε μερικά λεπτά της ώρας, της αύξησης της απόδοσης και της αύξησης της ποιότητας του τελικού εκχυλίσματος.

Οι υπέρηχοι είναι διαμήκη μηχανικά κύματα που διαδίδονται σε ένα ελαστικό μέσο. Είναι ηχητικά κύματα με συχνότητα άνω των 20 kHz που ξεπερνούν το ανώτατο όριο της ανθρώπινης ακοής. Η χρήση των υπερήχων στις διεργασίες τροφίμων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της ενέργειας που παράγεται. Πιο συγκεκριμένα, υπέρηχοι υψηλής συχνότητας (>100 kHz)-χαμηλής έντασης (<1 W/cm^2) χρησιμοποιούνται σε μη καταστρεπτικές αναλύσεις, κυρίως για αξιολόγηση της ποιότητας προϊόντων και

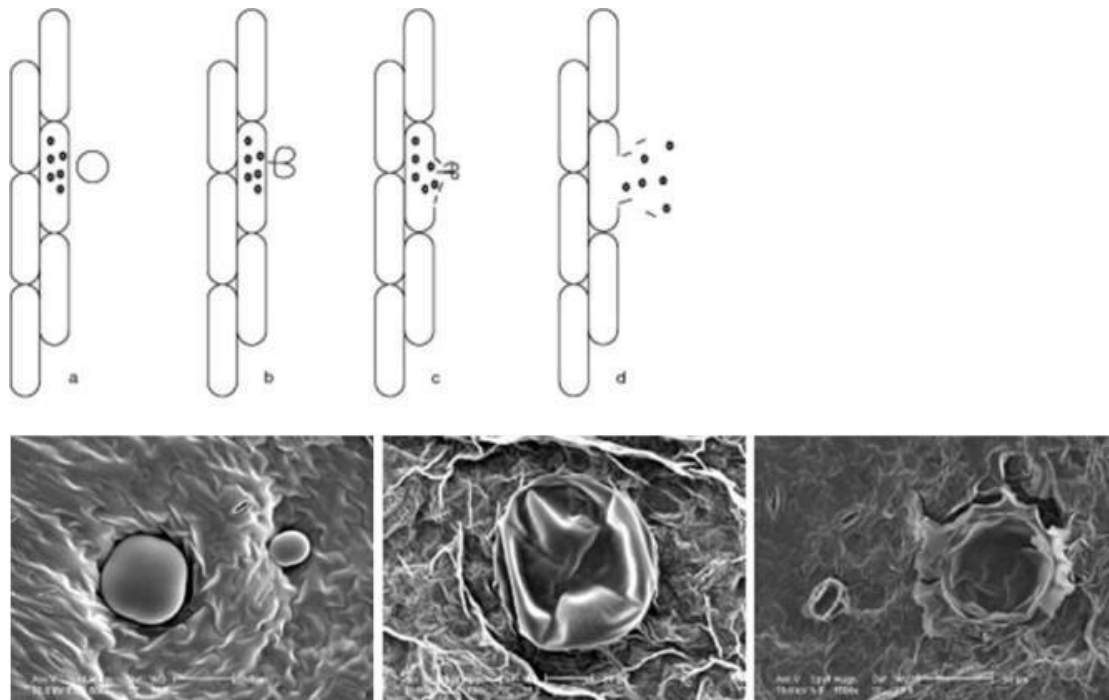
διαδικασιών, όπως η ανάλυση σύνθεσης. Εφαρμόζονται ως αναλυτική τεχνική για παροχή πληροφοριών που αφορούν φυσικοχημικές ιδιότητες τροφίμων π.χ. οξύτητα, περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μείωση μεταλλικών ιόντων και οξείδωση οργανικών ρυπαντών. Από την άλλη, υπέρηχοι χαμηλής συχνότητας (20-100 kHz)-υψηλής έντασης (10-1000 W/cm²) χρησιμοποιούνται για βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τροφίμων ή για βελτίωση της απόδοσης των διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα, αφορούν εκχυλίσεις βιοδραστικών και οργανικών μορίων, απενεργοποιήσεις μικροοργανισμών και ενζύμων, διεργασίες κατάψυξης, τεμαχισμού τροφίμων και βελτίωση ποιότητας γαλακτωμάτων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι υπέρηχοι εφαρμόζονται πιο συχνά σε συστήματα στερεού-υγρού, παρά σε συστήματα στερεού-αερίου. (Alexandre et al., 2018, Esclapez et al., 2011, Picó, 2013)

Αρχή και Μηχανισμός της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους βασίζεται κυρίως στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης. Ακουστική σπηλαιώση ονομάζεται η δημιουργία, η αύξηση του μεγέθους και η διάρρηξη φυσαλίδων κατά τη μετάδοση των κυμάτων υπερήχων. Πιο συγκεκριμένα, η διάδοση κυμάτων υπερήχων σε ένα υγρό δημιουργεί μία σειρά συμπίεσεων και αποσυμπίεσεων που προκαλούν μεταβολή της πίεσης. Με αυτόν τον τρόπο τα μόρια του υγρού μέσου που ενώνονται με ελκτικές δυνάμεις, αναδιατάσσονται, εκτοπίζονται από την αρχική τους θέση και κατά τις συμπίεσεις συγκρούονται με τα γειτονικά τους μόρια. Στις αποσυμπίεσεις δημιουργείται αρνητική πίεση, που απομακρύνει τα μόρια μεταξύ τους, και η τιμή της εξαρτάται από τη φύση και την καθαρότητα του υγρού. Αυτή η αρνητική πίεση κατά τη φάση της αποσυμπίεσης μπορεί να δημιουργήσει φυσαλίδες αέρα μέσα στον όγκο του υγρού. Οι φυσαλίδες αυξάνονται σε μέγεθος, μέσω εισχώρησης αέρα σε αυτές κατά τις αποσυμπίεσεις. Οι φυσαλίδες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις σταθερές και τις παροδικές. Οι σταθερές φυσαλίδες υποβάλλονται σε πολλές σειρές συμπίεσεων-αποσυμπίεσεων και ταλαντεύονται μη γραμμικά γύρω από ένα σημείο ισορροπίας. Οι παροδικές φυσαλίδες αντέχουν λίγες σειρές συμπίεσεων-αποσυμπίεσεων, διότι αυξάνεται γρήγορα το μέγεθός τους, τουλάχιστον στο διπλάσιο του αρχικού. Έτσι, βίαια καταπίπτουν σε μικρότερες φυσαλίδες. Αφού η συχνότητα του κύματος είναι ανάλογη με το μέγεθος των φυσαλίδων, κατά τους υπέρηχους δημιουργούνται φυσαλίδες μεγαλύτερου μεγέθους. Οι σταθερές και οι παροδικές φυσαλίδες μεγαλώνουν, έως ότου φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος κατά τη διάρκεια των συμπίεσεων όπου η ενέργεια που προσφέρεται από το κύμα δεν αρκεί για διατήρηση της φάσης ατμού μέσα στις φυσαλίδες. Έτσι, συμβαίνει μία ξαφνική συμπύκνωση και οι φυσαλίδες διαρρηγνύονται. Μεγάλες ποσότητες ενέργειας μπορούν να μετατραπούν από κινητική ενέργεια των μορίων σε θερμότητα. Ακολούθως, δημιουργούνται ακραίες συνθήκες σε αυτήν τη θέση: θερμοκρασίες 500-5000 K και πιέσεις 1000 atm. Από τη διάρρηξη των φυσαλίδων σπηλαιώσης, λόγω των υψηλών τιμών θερμοκρασίας και πίεσης, προκαλούνται κύματα κρούσης (κύματα με τοπική ταχύτητα μεγαλύτερη από την ταχύτητα του ήχου στο μέσο) και γενικές αναταράξεις και αναδεύσεις που φέρουν

φυσικές και χημικές μεταβολές στο υγρό μέσο. Επίσης, δημιουργούνται μικροπίδακες προς τα κύτταρα, που προκαλούν δημιουργία πόρων στα κυτταρικά τοιχώματα και εν τέλει τη ρήξη τους. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η διάχυση διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και ο ρυθμός απομάκρυνσης των συστατικών του κυττάρου από αυτά. Αυτά είναι τα φυσικά φαινόμενα που αποτελούν τον μηχανισμό των υπερήχων και δημιουργούνται από την ακουστική σπηλαίωση, η οποία μπορεί να εμφανιστεί μόνο σε υγρά ή σε υγρά που περιέχουν στερεά συστατικά. (Azmir et al., 2013, Chemat et al., 2017, Kumari et al., 2018, Picó, 2013)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους είναι ιδανική για την εκχύλιση συστατικών από φυτικές πρώτες ύλες, διότι διευκολύνεται η έκπλυση οργανικών και ανόργανων ενώσεων από τη μήτρα του φυτού. Οι μικροπίδακες που δημιουργούνται από τη διάρρηξη των φυσαλίδων σπηλαίωσης αυξάνουν τη μεταφορά μάζας και τη διάχυση του διαλύτη μέσα στα φυτικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.3, μία φυσαλίδα σπηλαίωσης έχει δημιουργηθεί κοντά στην επιφάνεια ενός φυτικού κυττάρου (a). Κατά τη διάρκεια μίας σειράς συμπίεσεων, η φυσαλίδα διαρρηγνύεται (b) και ένας μικροπίδακας κατευθύνεται προς το κύτταρο (c). Λόγω της αυξημένης πίεσης και θερμοκρασίας, το κυτταρικό τοίχωμα διαρρηγνύεται και το περιεχόμενο του κυττάρου απελευθερώνεται στο υγρό μέσο (d). Από μελέτες που έχουν γίνει σε φυτικά παραπροϊόντα, φαίνεται ότι οι υπέρηχοι αποδυναμώνουν τα εξωτερικά στρώματα άκαμπτων υλικών, όπως των πίτουρων και των φλοιών. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Picó, 2013)



Σχήμα 2.3. Σπηλαίωση-διάρρηξη φυσαλίδας και απελευθέρωση ενδοκυτταρικού περιεχομένου: παράδειγμα εκχύλισης αιθέριου ελαίου από βασιλικό

Πηγή: Picó, 2013

Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση και Εξοπλισμός

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, οι οποίες επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης. Η μελέτη αυτών των παραμέτρων είναι αναγκαία για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και την εκχύλιση σε βιομηχανικό επίπεδο. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι εκτός από την απόδοση της εκχύλισης, σκοπός είναι και η μείωση της κατανάλωσης ενέργειας, της κατανάλωσης πρώτων υλών και του κόστους. Η αριστοποίηση της διεργασίας είναι μείζονος σημασίας. Οι παράμετροι είναι η ισχύς, η συχνότητα, η ένταση, το μήκος και το πλάτος των κυμάτων υπερήχων, ο χρόνος, το είδος και το μέγεθος του αντιδραστήρα, η θερμοκρασία, η πίεση, ο διαλύτης, η αναλογία στερεού/διαλύτη, το μέγεθος και η δομή των σωματιδίων.

Γενικά, με την αύξηση της ισχύος των υπερήχων, αυξάνεται η διατμητική τάση που προκαλείται στο μέσο, άρα και η απόδοση. Στη βιομηχανία τροφίμων, όμως, η ελάχιστη δυνατή τιμή ισχύος φέρει τα καλύτερα αποτελέσματα. Κάποιες μελέτες, ωστόσο, έχουν δείξει ότι η μεταβολή της τιμής της, οδηγεί σε εκλεκτικότητα κάποιων μορίων στόχων. Η συχνότητα που συνήθως χρησιμοποιείται στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους είναι από 20 kHz μέχρι 100 kHz. Όσο αυξάνεται η συχνότητα των υπερήχων, τόσο μειώνεται η εμφάνιση του φαινομένου της σπηλαιώσης, διότι μειώνεται η φάση της αποσυμπίεσης κατά την οποία μεγαλώνει μία φυσαλίδα σπηλαιώσης. Επιπλέον, με αύξηση της συχνότητας μειώνεται και η μεταφορά μάζας, άρα προσθετικά η απόδοση της εκχύλισης. Αντίθετα, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται γραμμικά με την ένταση των υπερήχων εκφρασμένη ως ενέργεια ανά χρόνο ανά επιφάνεια εκπομπής. Με αύξηση της έντασης των υπερήχων, οι φυσαλίδες σπηλαιώσης διαρρηγνύονται πιο βίαια. Όσον αφορά το πλάτος του κύματος των υπερήχων, αύξησή του οδηγεί σε αύξηση της έντασης, αλλά σε αδυναμία διάδοσης του κύματος. Εξαίρεση αποτελούν τα ιξώδη υγρά π.χ. έλαιο, στα οποία εφαρμόζονται υπέρηχοι αυξημένου πλάτους. Επίσης, η θερμοκρασία είναι ένας κρίσιμος παράγοντας. Γενικά, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο αυξάνεται ο ρυθμός μεταφοράς μάζας και η απόδοση εκχύλισης. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη διεισδυτικότητα του διαλύτη στα κύτταρα, στην αυξημένη απελευθέρωση των συστατικών και στην αυξημένη διαλυτότητα. Ωστόσο, με μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας, μειώνεται η απόδοση ειδικά για θερμοευαίσθητες ή πτητικές ουσίες. Σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας εξατμίζεται ο διαλύτης πιο εύκολα και σε μεγαλύτερο βαθμό και αυξάνεται το κόστος της ενέργειας. Είναι σημαντικό να επιλεγεί κατάλληλη θερμοκρασία αναλόγως του προς εκχύλιση συστατικού και να γίνει βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις άλλες παραμέτρους. Εκτός από την επιλογή της θερμοκρασίας, σημαντική είναι και η επιλογή του διαλύτη, που μπορεί να μην είναι η ίδια με την αντίστοιχη της συμβατικής εκχύλισης. Η επιλογή του διαλύτη γίνεται σύμφωνα με τη διαλυτότητα των προς εκχύλιση συστατικών, αλλά και σύμφωνα με τα φυσικά χαρακτηριστικά του διαλύτη, όπως το ιξώδες, η επιφανειακή τάση και η τάση ατμών που επηρεάζουν το φαινόμενο της σπηλαιώσης. Η αύξηση του ιξώδους ή αύξηση της επιφανειακής τάσης του διαλύτη αυξάνει τις διαμοριακές δυνάμεις και

μειώνει την απόδοση της εκχύλισης. Αν χρησιμοποιηθεί διαλύτης με μεγάλο ιξώδες, τότε απαιτείται αύξηση της έντασης των υπερήχων. Επίσης, προτιμάται η χρήση διαλύτη με χαμηλή τάση ατμών, διότι γίνεται πιο βίαια η ρήξη των φυσαλίδων σπηλαιώσης. Δηλαδή, προτιμάται η χρήση οικονομικών διαλυτών για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, όπως είναι το νερό. Η επιλογή του λόγου στερεού/διαλύτη πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να αυξάνεται ο ρυθμός εκχύλισης, αλλά να μην αυξάνεται το ενεργειακό και το οικονομικό κόστος. Τέλος, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος δεν σημαίνει αύξηση της απόδοσης. Να σημειωθεί ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης, όπως η προκατεργασία του δείγματος, η διατήρηση και αποθήκευση του δείγματος, η ύπαρξη φυσαλίδων αερίου μέσα στο υγρό και η εξωτερική πίεση. Όσον αφορά την προκατεργασία του δείγματος, η μείωση της υγρασίας αυξάνει την επιφάνεια επαφής διαλύτη και στερεών και άρα την απόδοση της εκχύλισης. (Chemat et al., 2017, Esclapez et al., 2011)

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπέρηχους είναι το είδος των εκχυλιστήρων. Καταρχάς, για την εκχύλιση με υπέρηχους μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε λουτρά υπερήχων, είτε εκχυλιστήρες κλειστού τύπου εξοπλισμένοι με αισθητήρα μετατροπής υπερήχων. Τα λουτρά υπερήχων είναι πιο απλές διατάξεις, μπορούν να εκχυλίσουν κάποιο δείγμα που βρίσκεται μέσα στον περιέκτη του και είναι περισσότερο διαθέσιμες. Όμως, δεν προσφέρουν μεγάλα ποσά ενέργειας και λειτουργούν σε μία συχνότητα, συνήθως 40 kHz. Οι εκχυλιστήρες κλειστού τύπου εξοπλισμένοι με αισθητήρα μετατροπής υπερήχων εφαρμόζονται άμεσα στο δείγμα, ομογενοποιούν το δείγμα, παρέχουν τουλάχιστον 100 φορές περισσότερη ενέργεια, αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης και απαιτούν λιγότερο χρόνο εκχύλισης, αλλά είναι πιο ακριβοί και το δείγμα δεν μπορεί να βρίσκεται μέσα σε κάποιον περιέκτη, διότι εφαρμόζονται κατευθείαν στο δείγμα. Γενικά οι εκχυλιστήρες κλειστού τύπου που είναι εξοπλισμένοι με αισθητήρα μετατροπής υπερήχων προτιμώνται, έναντι των λουτρών υπερήχων. (Chemat et al., 2017, Esclapez et al., 2011, Picó, 2013)

Εφαρμογές της μεθόδου στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους έχει μελετηθεί από πολλούς για την εκχύλιση πρωτεϊνών. Οι Dong et al., 2011 μελέτησαν τα χαρακτηριστικά και τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών που έχουν προέλθει από πίτα ελαιοκράμβης με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους, υπερδιήθηση και ισοηλεκτρική καταβύθιση. Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή απελαιωμένη πίτα ελαιοκράμβης που αποτελεί την πρώτη ύλη διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 11,6, πριν την εκχύλιση με υπέρηχους. Οι συνθήκες της εκχύλισης βελτιστοποιήθηκαν, ώστε να προκύψει το μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων. Δοκιμάστηκε λόγος στερεού/υγρού ίσος με 1/20, 1/25 και 1/30, ισχύς των υπερήχων 400, 450 και 500 W και χρόνος εκχύλισης 70, 80 και 90 min. Μετά την εκχύλιση, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min και το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε μέσω υπερδιήθησης εγκάρσιας ροής με μεμβράνη που δεν επιτρέπει τη διέλευση μορίων

μεγαλύτερων από 8 kDa. Έπειτα οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με ξήρανση υπό κατάψυξη. Το υπερκείμενο υγρό φυγοκεντρήθηκε για 20 min, αφότου το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5,8. Οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με ξήρανση υπό κατάψυξη. Εν τέλει, το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 3,6 και οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν και πάλι με ξήρανση υπό κατάψυξη. Για σύγκριση, πραγματοποιήθηκε και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους με διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 8,0 και έπειτα ακολούθησε ισοηλεκτρική καταβύθιση σε pH 4,5. Οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με ξήρανση υπό κατάψυξη και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης ήταν οι 35 °C, αφού μεγαλύτερη θερμοκρασία μείωσε την ποιότητα των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης. Η βέλτιστη τιμή pH ήταν 11,5, ο χρόνος 84 min, η ισχύς 450 W και ο λόγος στερεού/υγρού 1/24. Υπό αυτές τις συνθήκες προέκυψε απόδοσης εκχύλισης 71,33%. Οι πρωτεΐνες που έχουν προκύψει με υπερδιήθηση είχαν μεγαλύτερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο και καλύτερες λειτουργικές ιδιότητες, σε σχέση με τις πρωτεΐνες που έχουν προκύψει με όξινη καταβύθιση. Η ανάλυση αμινοξέων των υπερδιηθημένων πρωτεϊνών έδειξε ότι είναι κατάλληλες για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπλέον, με χρήση υπερήχων η απόδοση εκχύλισης αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση υπερήχων και υπερδιήθησης προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα, κάνοντας την ελαιοκράμβη μία ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη για την παραλαβή πρωτεϊνών. Όσον αφορά τη σύγκριση σόγιας και ελαιοκράμβης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες ελαιοκράμβης είχαν μεγαλύτερο λόγο υδρόφοβων/υδρόφιλων αμινοξέων και καλύτερες λειτουργικές ιδιότητες (ικανότητα απορρόφησης ελαίου, γαλακτωματοποιητική ικανότητα, αφριστική ικανότητα και σταθερότητα) από τις πρωτεΐνες σόγιας.

Οι Görgüç et al., 2019 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών με χρήση υπερήχων και ενζύμων από παραπροϊόντα σησαμιού. Όσον, αφορά την εκχύλιση πρωτεϊνών με υπέρηχους, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση εκχύλισης αυξήθηκε από 39,8% σε 58,5% με χρήση των υπερήχων σε 630 W, 54 °C και 86 min. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται σημαντικά από την ισχύ των υπερήχων, τη θερμοκρασία και τον χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ απόδοσης-ισχύος και απόδοσης-χρόνου για συγκεκριμένη θερμοκρασία 40 °C. Σε μεγάλους χρόνους εκχύλισης παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης της απόδοσης, λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών.

Οι Zhu et al., 2009 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών από απειλωμένο άλευρο σίτου, υποβοηθούμενη από υπέρηχους και αντίστροφα μικκύλια (είναι μικκύλια που έχουν τις υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων στραμμένες προς το εσωτερικό και σχηματίζονται σε μη πολικούς διαλύτες). Η προκατεργασία με υπέρηχους αύξησε την απόδοση της εκχύλισης από 37% σε 57% με τελική απόδοση εκχύλισης ίση με 45,6%, αν ληφθεί υπόψιν και το στάδιο της επανεκχύλισης. Γενικά, κάθε στάδιο της διεργασίας εκχύλισης μπορεί να επηρεάσει την απόδοση, τις ιδιότητες των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο (Gençdağ et al., 2020). Οι βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης με υπέρηχους των Zhu et al είναι ισχύς 363 W, 24 min και παλμός 2,4 s ανοιχτός και 2 s κλειστός. Επιπλέον, αύξηση της ισχύος πέρα των

363 W, δεν έδειξε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης, το οποίο οφείλεται στο ότι το σύστημα εκχύλισης έχει ισορροπήσει. Τέλος, το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν είναι ότι η εκχύλιση με υπέρηχους και αντίστροφα μικκύλια έχει μεγάλες δυνατότητες αύξησης κλίμακας από εργαστηριακή σε βιομηχανική για εμπορικούς σκοπούς.

Οι Ochoa-Rivas et al., 2017 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών από άλευρο αραχίδας. Εφάρμοσαν τη μέθοδο των μικροκυμάτων που προαναφέρθηκε και τη μέθοδο των υπερήχων. Όσον αφορά την εκχύλιση πρωτεϊνών με υπέρηχους, έκαναν βελτιστοποίηση του χρόνου (15-40 min) και του πλάτους κύματος (20-100%), το οποίο καθορίζει την ισχύ του κύματος και μαζί με τη συχνότητα την ενέργεια του κύματος. Για βέλτιστο χρόνο 15 min και πλάτος κύματος 100%, επιτεύχθηκε αύξηση κατά 136% των τελικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Οι τελικές πρωτεΐνες είχαν καθαρότητα 86%. Οι Ochoa-Rivas et al. μελέτησαν τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη χρήση υπερήχων αυξήθηκε η ικανότητα απορρόφησης νερού και η αφριστική ικανότητα, ενώ έμεινε ίδια η ικανότητα απορρόφησης ελαίου. Επιπλέον, η μικροδομή των πρωτεϊνών των υπερσυμπυκνωμάτων δεν επηρεάστηκε από τους υπέρηχους, ενώ η δευτεροταγής δομή άλλαξε. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των β-πτυχωτών φύλλων και μία τάσης μείωσης των α-ελίκων σε σχέση με τα υπερσυμπυκνώματα της συμβατικής εκχύλισης. Τέλος, η εφαρμογή υπερήχων ακολουθούμενη από μικροκύματα δεν έδειξε σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα από ότι οι υπέρηχοι.

Γενικά, οι υπέρηχοι μπορούν να συνδυαστούν με άλλες μεθόδους και να φέρουν καλύτερα αποτελέσματα, όπως μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών. Για παράδειγμα καλύτερα αποτελέσματα έχει φέρει η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους και ένζυμα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους και διάλυμα αντιστρόφων μικκυλίων, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών κ.α. (Gençdağ et al., 2020, Görgüç et al., 2019, Zhu et al., 2009)

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπέρηχους φέρει αρκετά πλεονεκτήματα ως μέθοδος. Αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης λόγω του φαινομένου της σπηλαιώσης και της αυξημένης μεταφοράς μάζας, αυξάνει την καθαρότητα των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο, το κόστος και την κατανάλωση διαλύτη. Επιτρέπει την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών και αποτελεί μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Από την άλλη, μπορεί να φέρει αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών, να μετουσιώσει τις πρωτεΐνες ή να χειροτερέψει τις ιδιότητές τους, όπως τη γαλακτωματοποιητική και την αφριστική ικανότητα. Για αυτό δε συνιστάται μεγάλος χρόνος εκχύλισης με υπέρηχους ή αυξημένη ισχύς τους. (Gençdağ et al., 2020, Rojić et al., 2018)

2.3.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed electric field, PEF)

Γενικά

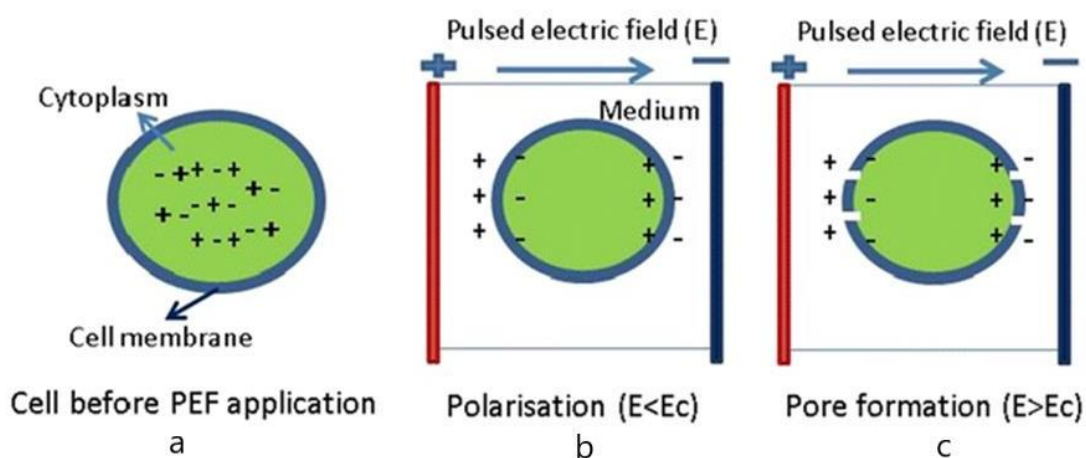
Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελεί μία μη θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για υποβοήθηση των διεργασιών συμπίεσης, ξήρανσης, εκχύλισης, διάχυσης, απενεργοποίησης μικροοργανισμών και ενζύμων, αλλά και των διεργασιών διατήρησης των τροφίμων. Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελούν μία μέθοδο ηλεκτρικής παλμικής ενέργειας, όπως και η μέθοδος ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης. Η μέθοδος των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε μελέτες μεταφοράς γονιδίων χρησιμοποιώντας μόρια DNA. Πλέον, χρησιμοποιείται ευρέως για εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτικές πρώτες ύλες. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Gharib-Bibalan, 2018, Jeyamkondan et al., 1999)

Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παλμοί μικρής διάρκειας (μs έως ms) και μέτριας ηλεκτρικής έντασης (συνήθως μεταξύ 0,5-20 kV/cm) εφαρμόζονται σε ένα δείγμα που είναι τοποθετημένο ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια. Να σημειωθεί ότι αν σκοπός της εφαρμογής παλμικών ηλεκτρικών πεδίων δεν είναι η εκχύλιση συστατικών, αλλά η διατήρηση των τροφίμων και η απενεργοποίηση μικροοργανισμών ή ενζύμων, χρησιμοποιείται υψηλότερη ηλεκτρική ένταση (15-50 kV/cm), μικρότερη διάρκεια παλμών και διαφορετικός εξοπλισμός. Επίσης, χαμηλής έντασης παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελούν μία αποτελεσματική μέθοδο προκατεργασίας για την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτικά κύτταρα. (Kumari et al., 2018)

Αρχή και Μηχανισμός της μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία βασίζεται στην αρχή της ηλεκτροδιάτρησης λόγω της διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης. Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως πυκνωτής χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς και έχει φυσικό διαμεμβρανικό δυναμικό λόγω ύπαρξης μηδενικού φορτίου που προκύπτει ως άθροισμα φορτίων αντίθετης πολικότητας που υπάρχουν κατά μήκος της μεμβράνης στην εσωτερική και εξωτερική επιφάνειά της, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.4.(b). Το σύνηθες διαμεμβρανικό δυναμικό ισούται με 10 mV. Όταν σε ένα κύτταρο εφαρμόζεται εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, το διαμεμβρανικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνεται λόγω της συσσώρευσης φορτίων κατά μήκος της μεμβράνης. Περαιτέρω έκθεση του κυττάρου στο πεδίο, προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση του διαμεμβρανικού δυναμικού που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτροστατικών έλξεων ανάμεσα στα φορτία αντίθετης πολικότητας. Έτσι, το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης μειώνεται και στη συνέχεια δημιουργούνται πόροι και η μεμβράνη διαρρηγνύεται όταν το δυναμικό φτάσει την τιμή του κρίσιμου διαμεμβρανικού δυναμικού, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2.4.(c). Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται μία δύναμη επαναφοράς που αντιτίθεται στη συμπίεση της κυτταρικής μεμβράνης. Όμως, η δύναμη συμπίεσης αυξάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τη δύναμη

επαναφοράς λόγω του μειωνόμενου πάχους της μεμβράνης και για αυτόν τον λόγο συμβαίνει τοπική διάρρηξη της μεμβράνης. Το κρίσιμο διαμεμβρανικό δυναμικό κατά το οποίο συμβαίνουν τα παραπάνω ισούται περίπου με 1 V.



Σχήμα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροδιάτρησης μίας κυτταρικής μεμβράνης όταν εκτίθεται σε ηλεκτρικό πεδίο E , όπου E_c η κρίσιμη ηλεκτρική ένταση πεδίου

Προέλευση: Kumari et al., 2018 μετά από προσαρμογή

Η ηλεκτροδιάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή. Αυτό εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη διάρκεια των παλμών και τον αριθμό τους. Η διαπερατότητα, και άρα η ηλεκτροδιάτρηση, είναι αντιστρεπτή όταν δημιουργούνται μικροί πόροι σε σχέση με τη συνολική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ είναι μη αντιστρεπτή όταν δημιουργούνται μεγαλύτεροι πόροι λόγω της αυξημένης διάρκειας έκθεσης του κυττάρου άνω του κρίσιμου διαμεμβρανικού δυναμικού. Στην αντιστρεπτή ηλεκτροδιάτρηση οι πόροι κλείνουν με την πάροδο του χρόνου, ενώ στη μη αντιστρεπτή ηλεκτροδιάτρηση συμβαίνει τελικά κυτταρικός θάνατος, λόγω ολικής διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης και απώλειας του ενδοκυτταρικού περιεχομένου. (Azmir et al., 2013, Jeyamkondan et al., 1999, Kumari et al., 2018)

Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση και Εξοπλισμός

Η απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενης από παλμικά ηλεκτρικά πεδία σχετίζεται άμεσα με τον δείκτη κυτταρικής διάρρηξης Z όπου $Z=0$ δηλώνει άθικτα κύτταρα και $Z=1$ δηλώνει πλήρως κατεστραμμένα κύτταρα. Η απόδοση εκχύλισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες της διεργασίας, όπως την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τον χρόνο επεξεργασίας, την ειδική ενέργεια που αποδίδεται στο σύστημα, τον αριθμό, τη συχνότητα και το σχήμα των παλμών, τη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται, την αγωγιμότητα, αλλά και το pH, τα ιόντα, τη γεωμετρία, το μέγεθος και τη σύσταση του δείγματος. Ειδικότερα, όσο αυξάνεται ο χρόνος επεξεργασίας, τόσο αυξάνεται ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης και όσο αυξάνεται η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τόσο πιο έντονη είναι η αύξηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης με τον χρόνο επεξεργασίας. Επιπλέον, το σχήμα των παλμών (ορθογώνιοι ή εκθετικοί), η διάρκεια

και η συχνότητά τους εξαρτώνται από τη γεννήτρια παλμών. Γενικά έχει βρεθεί ότι οι ορθογώνιοι παλμοί είναι πιο αποτελεσματικοί από τους εκθετικούς παλμούς. Να σημειωθεί ότι ένα σύστημα παλμικών ηλεκτρικών πεδίων αποτελείται από τη γεννήτρια υψηλής τάσης, τη συστοιχία παράλληλων πυκνωτών, τον διακόπτη υψηλής τάσης και τον θάλαμο επεξεργασίας, στον οποίο το δείγμα τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια και έρχεται σε επαφή με το ηλεκτρικό πεδίο. Αναλόγως του είδους του θαλάμου επεξεργασίας, η διεργασία μπορεί να είναι είτε συνεχούς έργου, είτε διαλείποντος έργου. (Azmir et al., 2013, Gençdağ et al., 2020, Von Der Haar et al., 2014)

Εφαρμογές της μεθόδου στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία μπορούν να αυξήσουν την απόδοση της εκχύλισης και να μειώσουν τον χρόνο της εκχύλισης, αφού μέσω της κυτταρικής διάρρηξης αυξάνουν τη μεταφορά μάζας. Έχει βρεθεί ότι παλμικά ηλεκτρικά πεδία μέτριας ηλεκτρικής έντασης 0,5-1 kV/cm και χρόνου 10^{-4} - 10^{-2} s αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των φυτικών κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της, συνοδευόμενη από μία μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Με αυτόν τον τρόπο δεν υποβαθμίζεται η ποιότητα των εκχυλιζόμενων θερμοευαίσθητων συστατικών, αλλά και γενικότερα με την αποφυγή της θέρμανσης διατηρείται η ποιότητα των τροφίμων. Εκτός από την εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία, τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα στάδιο προκατεργασίας της εκχύλισης. (Azmir et al., 2013, Kumari et al., 2018)

Οι Yu et al., 2015 μελέτησαν την εκχύλιση πρωτεϊνών και πολυφαινολών από βλαστούς και φύλλα ελαιοκράμβης με τη μέθοδο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Η προκατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (0,2-20 kV/cm) αυξάνει την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών, αφού καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Ο βαθμός καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τον χρόνο επεξεργασίας. Για την εκχύλιση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε υψηλή τιμή ηλεκτρικής έντασης, πιο συγκεκριμένα 20 kV/cm, η οποία αύξησε την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών σε 80%. Όμως με αυτόν τον τρόπο, υπήρξε μεγάλη κατανάλωση ενέργειας. Όσον αφορά τις συνθήκες της διεργασίας, ανάμεσα στο νερό και το μείγμα νερού/αιθανόλης (25% w/w), ο διαλύτης που επιλέχθηκε για την εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι το νερό. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών δεν ήταν ορατή. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάκτηση πρωτεϊνών από βλαστούς και φύλλα ελαιοκράμβης είναι ίση με 20 °C και η βέλτιστη τιμή pH εκχύλισης είναι ίση με 7.

Οι Sarkis et al., 2015 μελέτησαν την επίδραση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στην εκχύλιση πρωτεϊνών και πολυφαινολών από σησαμόπιτα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν ηλεκτρική ένταση ίση με 13,3 kV/cm για την εκχύλιση πρωτεϊνών και τα αποτελέσματα έδειξαν απόδοση 30-40%. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές εισροές ενέργειας και για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία βρέθηκε βέλτιστη εισροή ενέργειας ίση με 125 kJ/kg, για την οποία το κύτταρο καταστράφηκε

κατά 67% και επιτεύχθηκε το μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία είχαν παλμούς διάρκειας 10 μ s και συχνότητας 0,5 Hz. Συμπερασματικά, έγινε αντιληπτό ότι η χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μείωσε την απαιτούμενη ποσότητα οργανικών διαλυτών και την απαίτηση υψηλών θερμοκρασιών.

Οι Parniakov et al., 2014 μελέτησαν το στάδιο της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία πριν το στάδιο της εκχύλισης πρωτεϊνών από φλοιούς παπάγιας. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για προκατεργασία διαλείποντος έργου, ηλεκτρικής έντασης 13,33 kV/cm, χρόνου 2720 s (~3/4 h), αριθμού παλμών 400, pH=7 και θερμοκρασίας 20 °C, η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών αυξήθηκε σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση χωρίς το στάδιο της προκατεργασίας. Η τελική συγκέντρωση των πρωτεϊνών προέκυψε ίση με 20 mg/L.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου

Τα τελευταία χρόνια ενδιαφέρον έχει η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στην ανάκτηση βιοδραστικών μορίων από παραπροϊόντα τροφίμων, κυρίως επειδή είναι μη θερμική μέθοδος. Οι περισσότερες εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από παλμικά ηλεκτρικά πεδία αφορούν πολυφαινόλες, έρευνες όμως έχουν γίνει και για την εκχύλιση πρωτεϊνών. Γενικά, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είτε στο στάδιο της εκχύλισης, είτε ως προκατεργασία. Κατά την εκχύλιση, η μέθοδος των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορεί να εφαρμοστεί μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλη νέα μέθοδο εκχύλισης για περαιτέρω αύξηση της απόδοσης. Ως μέθοδος είναι οικονομική, πράσινη και βιώσιμη, αλλά για εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα, μειονέκτημα αποτελεί το υψηλότερο κόστος της γεννήτριας υψηλής τάσης και του διακόπτη υψηλής τάσης, που αποτελούν μέρη του συστήματος των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. (Gençdağ et al., 2020, Jeyamkondan et al., 1999, Kumari et al., 2018)

2.3.6 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης (High voltage electrical discharge, HVED)

Γενικά

Η εφαρμογή των ηλεκτρικών εκκενώσεων σε υγρό μέσο αποτελεί μέθοδο ηλεκτρικής παλμικής ενέργειας, μαζί με τη μέθοδο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, και έχει χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για πολλές διαφορετικές εφαρμογές, όπως ο καθαρισμός του νερού από οργανικούς ρυπαντές, η απενεργοποίηση μικροοργανισμών, η ηλεκτροϋδραυλική συμπίεση στερεών και η γεώτρηση πετρελαίου. Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή ηλεκτρικών εκκενώσεων σε νερό έχει προσφάτως αναπτυχθεί για υποβοήθηση της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από διάφορες πρώτες ύλες ιδίως παραπροϊόντα τροφίμων, διότι αποτελεί μία μη θερμική μέθοδο χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας, που δεν υποβαθμίζει την ποιότητα της πρώτης ύλης.

Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης, το δείγμα τοποθετείται στον θάλαμο επεξεργασίας και ειδικότερα μέσα στο υγρό μέσο και ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια. Η παλμική ηλεκτρική ενέργεια υψηλής τάσης παράγεται ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια και παρέχεται στο υγρό μέσο, που είναι συνήθως νερό. Να σημειωθεί ότι η ηλεκτρική ένταση που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση συστατικών είναι χαμηλή ($<1 \text{ kV/cm}$), ενώ η ηλεκτρική ένταση που χρησιμοποιείται για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών είναι υψηλή ($>20 \text{ kV/cm}$).

Αρχή και Μηχανισμός της μεθόδου

Η μέθοδος ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης προσφέρει ηλεκτρική ενέργεια στα κύτταρα που προκαλεί διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών και αυξάνει τον βαθμό εκχύλισης των εκχυλιζόμενων συστατικών. Η ύπαρξη ηλεκτρικής εκκένωσης ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια δημιουργεί ένα ρεύμα ιόντων που επηρεάζει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Η διαπερατότητα επηρεάζεται και από τη δημιουργία κυμάτων κρούσης (που διαρκούν μερικά ms), φυσαλίδων σπηλαιώσης και γενικών αναταραχών και αναδεύσεων στο υγρό μέσο. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου και συνεπώς την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη διαπερατότητα των κυττάρων είναι η δημιουργία φυσαλίδων αέρα λόγω της εσωτερικής θέρμανσης του υλικού. Να σημειωθεί ότι η δημιουργία ή μη των κυμάτων κρούσης εξαρτάται από τις συνθήκες της ηλεκτρικής εκκένωσης, όπως η γεωμετρία των ηλεκτροδίων, η απόσταση μεταξύ τους, η αγωγιμότητα του υγρού μέσου κλπ.

Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση και Εξοπλισμός

Η απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενης από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης εξαρτάται από την ένταση της ηλεκτρικής ενέργειας, τον αριθμό των παλμών, την ηλεκτρική τάση, την αγωγιμότητα του υγρού μέσου, την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων, τον λόγο στερεού/υγρού, τη θερμοκρασία εκχύλισης, τη διάρκεια της εκχύλισης κ.α. Ο πιο σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας είναι η ένταση της ηλεκτρικής ενέργειας (ή ο αριθμός των παλμών). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι για κάποιες πρώτες ύλες υπάρχει μία βέλτιστη τιμή της έντασης της ηλεκτρικής ενέργειας. Από την τιμή αυτή και έπειτα, μπορούν να συμβούν ανεπιθύμητες χημικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας.

Το σύστημα εκχύλισης υποβοηθούμενης από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης αποτελείται από τη γεννήτρια παλμών υψηλής τάσης, τον θάλαμο επεξεργασίας, τη δεξαμενή εκκένωσης και την αντλία μεταφοράς. Επιπλέον, η διεργασία μπορεί να είναι συνεχούς έργου, διαλείποντος έργου και με ανακυκλοφορία. (Boussetta & Vorobiev, 2014, Gençdağ et al., 2020, Gharib-Bibalan, 2018)

Εφαρμογές της μεθόδου στην Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Όσον αφορά την εκχύλιση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης, οι Barba et al., 2015 χρησιμοποίησαν ως πρώτη ύλη ελαιοκράμβη και πίτα ελαιοκράμβης. Βελτιστοποίησαν τις παραμέτρους της παροχής ηλεκτρικής ενέργειας (0–400 kJ/kg) και του λόγου υγρού/στερεού (1:5–1:20, w/w). Για παροχή 240 kJ/kg και για τη μεγαλύτερη τιμή του λόγου υγρού/στερεού, βρέθηκε μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τελικού προϊόντος ίσο με $9,41 \pm 0,30$ g/100 g από την ελαιοκράμβη και $15,76 \pm 0,63$ g/100 g από την πίτα ελαιοκράμβης. Να σημειωθεί ότι το αρχικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο της πίτας ελαιοκράμβης ήταν μεγαλύτερο από της ελαιοκράμβης, αφού στην πίτα ελαιοκράμβης το περισσότερο έλαιο είχε απομακρυνθεί. Επιπλέον, προέκυψαν χαμηλές αποδόσεις εκχύλισης των πρωτεϊνών (<40%), διότι η μέθοδος της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης αποτέλεσε προκατεργασία απλής υδατικής διασποράς σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Δηλαδή, έπειτα από την προκατεργασία δεν ακολούθησε στάδιο εκχύλισης με κατάλληλο διαλύτη, όπως η αιθανόλη. Τελικά, έγινε αντιληπτό ότι η μέθοδος ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης αποτελεί αξιόπιστη τεχνική εκχύλισης πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων ή/και ως συμπληρώματα διατροφής.

Οι Parniakon et al., 2014 μελέτησαν την εκχύλιση διαφόρων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, από φλοιούς παπάγιας. Ειδικότερα μελέτησαν την εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης, αλλά και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία που αναλύθηκε προηγουμένως. Η συγκέντρωση των τελικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης (γεννήτριας 40 kV-10 kA) ήταν ίση με 60 mg/L για pH εκχύλισης ίσο με 7, θερμοκρασία 20 °C και χρόνο εκχύλισης 3/4 h. Να σημειωθεί ότι με μέθοδο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων προέκυψε τελική συγκέντρωση 20 mg/L. Δηλαδή, η μέθοδος της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης επέτυχε μεγαλύτερη ανάκτηση των πρωτεϊνών σε σχέση με τη εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία και από την αντίστοιχη συμβατική εκχύλιση. Από την άλλη, μπορεί να παραγάγει ανεπιθύμητα προϊόντα ηλεκτρόλυσης και δραστικές ελεύθερες ρίζες που θα υποβαθμίσουν την ποιότητα των τελικών πρωτεϊνών.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης αυξάνει την απόδοση εκχύλισης μέσω της καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτελεί μία πράσινη μέθοδο εκχύλισης, αφού ενισχύει τον βαθμό εκχύλισης των συστατικών χωρίς να καταναλώνει υψηλά επίπεδα ενέργειας, όπως η συμβατική μέθοδος εκχύλισης. Επιπλέον, μειώνει τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία εκχύλισης και την κατανάλωση του διαλύτη. Συγκριτικά με τις μεθόδους των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων και των υπερήχων, η μέθοδος της ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης φέρει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης. Επιπλέον, προκαλεί μικρή αύξηση της θερμοκρασίας σε σχέση με τη μέθοδο των υπερήχων και των μικροκυμάτων. Από την άλλη, πρέπει να είναι

προσεκτική η βελτιστοποίηση των παραμέτρων της διεργασίας, η οποία εξαρτάται από τη φύση των εκχυλιζόμενων συστατικών και το μέγεθος, το σχήμα και τη δομή των κυττάρων. Τέλος, μειονέκτημα αποτελεί η δημιουργία μικρών μορίων λόγω της χαμηλής παροχής ενέργειας που οδηγεί σε δυσκολία του μετέπειτα διαχωρισμού του στερεού από το υγρό. (Boussetta & Vorobiev, 2014, Gharib-Bibalan, 2018)

Κεφάλαιο 3 Ελαιοκράμβη

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναλύθηκαν νέες καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών από φυτικές πρώτες ύλες και κυρίως από ελαιούχους σπόρους και παραπροϊόντα τους. Ένας ελαιούχος σπόρος με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ο οποίος έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές για την εκχύλιση πρωτεϊνών και την παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, είναι η ελαιοκράμβη. Η ελαιοκράμβη μελετάται ως πηγή πρωτεϊνών διότι περιέχει πολλές πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας και θρεπτικής αξίας. (Xu & Diosady, 2003)

3.1 Καλλιέργεια ελαιοκράμβης

Η ελαιοκράμβη (rapeseed) ανήκει στο γένος *Brassica* της οικογένειας *Brassicaceae*. Τα κύρια είδη της είναι η *Brassica napus L.* και η *Brassica rapa L.* Στην οικογένεια *Brassicaceae* ανήκει επίσης και το λάχανο, το φυτό της μουστάρδας, το γογγύλι, το ραπανάκι και το κουνουπίδι. Η ελαιοκράμβη καλλιεργείται κυρίως για το έλαιο που περιέχει, αποτελώντας την τρίτη κυριότερη πηγή φυτικού ελαίου παγκοσμίως, μετά το σογιέλαιο και το φοινικέλαιο. Από την άλλη, αποτελεί την πρώτη φυτική πηγή ελαίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η καλλιέργεια της ελαιοκράμβης αποτελεί το 33% της συνολικής φυτικής καλλιέργειας. Το έτος 2014 η παραγωγή ελαιοκράμβης ήταν ίση με 24,3 Mt στην Ε.Ε. και 73,8 Mt παγκοσμίως. Το κραμβέλαιο, εκτός από εφαρμογές στα τρόφιμα, έχει δείξει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για εφαρμογή στην παραγωγή βιοντίζελ. Τα τελευταία χρόνια καλλιεργούνται για ανθρώπινη κατανάλωση διάφορα είδη ελαιοκράμβης με χαμηλή συγκέντρωση σε ερουκικό οξύ και γλυκοζινολιτικές ενώσεις. (Fetzer et al., 2018, Heuze et al., 2019, Heuze et al., 2020, Oreopoulou & Tzia, 2007)

Το φυτό της ελαιοκράμβης είναι από τα λίγα που δίνει βρώσιμους ελαιούχους σπόρους και μπορεί να αναπτυχθεί σε κλίματα χαμηλών θερμοκρασιών. Η ελαιοκράμβη φαίνεται να προέρχεται από την Ευρώπη, πλέον όμως καλλιεργείται παγκοσμίως. Οι πέντε κύριοι παραγωγοί ελαιοκράμβης είναι: Κίνα, Καναδάς, Ινδία, Γερμανία και Γαλλία. Σε περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας, όπου ο χειμώνας είναι ήπιος, η ελαιοκράμβη αναπτύσσεται τον χειμώνα (χειμερινές ποικιλίες), ενώ στον Καναδά, τη βόρεια Ευρώπη και την Αυστραλία, η ελαιοκράμβη αναπτύσσεται την άνοιξη (καλοκαιρινές ποικιλίες). Η ελαιοκράμβη μπορεί να καλλιεργηθεί σε ευρύ φάσμα κλιματολογικών συνθηκών, αρκεί το έδαφος να έχει καλή αποστράγγιση, μέτρια ποσότητα υγρασίας και μέτρια λίπανση. Η ελαιοκράμβη αντέχει σε εδάφη με pH 5,5-8,0. Επίσης, μπορεί να φυτρώσει μέσα σε μία ημέρα σε θερμοκρασίες εδάφους 21-25 °C, αλλά μπορεί να χρειαστεί 11-14 ημέρες για θερμοκρασία ~2 °C, από τη στιγμή που ο σπόρος θα απορροφήσει το νερό του εδάφους. Ο καρπός της ελαιοκράμβης έχει μήκος 6-9 cm και περιέχει 15-25 σπόρους. Οι ελαιούχοι σπόροι είναι μικροί (1-2 mm διάμετρος), σφαιρικοί και έχουν χρώμα από ανοικτό καφέ μέχρι μαύρο. Με ξήρανση και θραύση των καρπών απελευθερώνονται οι ελαιούχοι σπόροι. Συνήθως το 95% του ελαιούχου σπόρου συνθλίβεται και δίνει κραμβέλαιο (39%) και πίτα ως παραπροϊόν (60%). (Gunstone, 2009, Heuze et al., 2019)

3.2 Σύσταση σπόρων ελαιοκράμβης

Οι ελαιούχοι σπόροι της ελαιοκράμβης αποτελούν πηγή ελαίου και πρωτεϊνών. Το έλαιο βρίσκεται σε ποσοστό 46% ξ.β. (ποσοστό επί ξηρής βάσης) (40-50% ξ.β.) και οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε ποσοστό 21% ξ.β. (17-24% ξ.β.). Το ποσοστό του ελαίου είναι λίγο χαμηλότερο από το αντίστοιχο του ηλιόσπορου (48%), αλλά αρκετά υψηλότερο από εκείνο του λιναρόσπορου (37%), του ελαίου του σπόρου σόγιας (21%) και του ελαίου του βαμβακόσπορου (20%). Από την άλλη, το ποσοστό των πρωτεϊνών είναι χαμηλότερο από το ποσοστό των πρωτεϊνών των σπόρων σόγιας (40%) και του λιναρόσπορου (24%), παρόμοιο με το ποσοστό των πρωτεϊνών του βαμβακόσπορου (22%) και υψηλότερο από το ποσοστό των πρωτεϊνών του ηλιόσπορου (17%). Η σύσταση των ελαιούχων σπόρων της ελαιοκράμβης παρατίθεται στον πίνακα 3.1. (Heuze et al., 2019)

Πίνακας 3.1. Σύσταση των ελαιούχων σπόρων της double-low ελαιοκράμβης (χαμηλή συγκέντρωση σε ερουκικό οξύ και γλυκοζινολιτικές ενώσεις)

Προέλευση: Heuze et al., 2019, μετά από προσαρμογή

Κύρια ανάλυση	Μονάδα μέτρησης	Avg	SD	Min	Max	Αριθμός τιμών/δειγμάτων
Ξηρή βάση	% τροφοδοσίας	92,3	1,1	87,3	94,9	3.844
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	% ξ.β.	20,9	1,2	17,5	24,6	3.630
Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες	% ξ.β.	10,1	2,2	5,8	15,7	2.035
NDF*	% ξ.β.	20,4	4,6	13,2	30,5	78
ADF*	% ξ.β.	14,4	3,2	9,1	21,4	76
Λιγνίνη*	% ξ.β.	6,3	1,3	4,5	10,2	78
Έλαιο (που εκχυλίζεται με αιθέρα)*	% ξ.β.	46,0	2,1	39,8	51,0	1.598
Τέφρα	% ξ.β.	4,3	0,2	3,7	5,0	1.683
Άμυλο	% ξ.β.	3,7	0,9	2,7	5,7	9
Σάκχαρα	% ξ.β.	5,5	0,7	4,8	7,1	10
Ολική ενέργεια τροφής	MJ/kg ξ.β.	28,8	0,7	27,7	30,6	14 (η μέση τιμή προκύπτει από εξίσωση)
Ιχνοστοιχεία						
Ασβέστιο	g/kg ξ.β.	4,9	0,7	3,7	6,5	305
Φωσφόρος	g/kg ξ.β.	7,3	0,6	5,6	8,4	315
Κάλιο	g/kg ξ.β.	8,3	0,4	7,4	9,3	18
Νάτριο	g/kg ξ.β.	0,1	0,1	0,0	0,4	50
Μαγνήσιο	g/kg ξ.β.	2,6	0,3	2,0	3,1	11
Μαγγάνιο	mg/kg ξ.β.	42				1
Ψευδάργυρος	mg/kg ξ.β.	38				1

Χαλκός	mg/kg ξ.β.	3				1
Αμινοξέα						
Αλανίνη	% πρωτεΐνης	4,7	0,8	4,2	6,2	6
Αργινίνη	% πρωτεΐνης	6,2	0,6	5,6	7,3	7
Ασπαραγινικό οξύ	% πρωτεΐνης	7,6	0,7	6,8	8,9	7
Κυστεΐνη	% πρωτεΐνης	2,5	0,2	2,3	2,8	19
Γλουταμινικό οξύ	% πρωτεΐνης	18,0	1,7	16,2	21,0	6
Γλυκίνη	% πρωτεΐνης	5,5	0,9	4,4	6,9	7
Ιστιδίνη	% πρωτεΐνης	2,9	0,3	2,6	3,5	7
Ισολευκίνη	% πρωτεΐνης	4,3	0,7	3,9	5,6	7
Λευκίνη	% πρωτεΐνης	7,3	1,1	6,3	9,5	7
Λυσίνη	% πρωτεΐνης	6,3	0,3	5,8	6,8	22
Μεθειονίνη	% πρωτεΐνης	2,0	0,1	1,8	2,1	20
Φαινυλαλανίνη	% πρωτεΐνης	4,3	0,7	3,6	5,8	7
Προλίνη	% πρωτεΐνης	5,9	0,2	5,7	6,1	3
Σερίνη	% πρωτεΐνης	4,4	0,5	3,9	5,5	7
Θρεονίνη	% πρωτεΐνης	4,8	0,8	4,2	6,6	7
Τρυπτοφάνη	% πρωτεΐνης	1,3				1
Τυροσίνη	% πρωτεΐνης	3,1	0,3	2,9	3,5	5
Βαλίνη	% πρωτεΐνης	5,5	0,7	4,9	7,0	7
Λιπαρά οξέα						
Στεατικό οξύ C 18:0	% λιπαρών οξέων	1,7	0,5	1,3	3,3	13
Ελαϊκό οξύ C 18:1	% λιπαρών οξέων	59,9	2,1	53,5	61,7	13
Λινελαϊκό οξύ C 18:2	% λιπαρών οξέων	20,6	0,6	19,4	21,8	27
Λινολενικό οξύ C 18:3	% λιπαρών οξέων	10,1	0,8	8,9	11,6	13
Δευτερογενείς μεταβολίτες						
Ταννίνες (ταννικό οξύ)	g/kg ξ.β.	7,2		0,0	14,4	2
Συμπυκνωμένες ταννίνες (κατεχίνη)	g/kg ξ.β.	1,8				1
Γλυκοζινολιτικές ενώσεις	μmol/kg ξ.β.	14,48	4,28	5,88	31,21	1.419

NDF: Συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (ημικυτταρίνη, κυτταρίνη και λιγνίνη) (neutral detergent fiber)

ADF: Λιγότερο εύπεπτα συστατικά (κυτταρίνη και λιγνίνη) (acid detergent fiber)

Avg: Μέση ή προβλεπόμενη τιμή (average or predicted value)

SD: τυπική απόκλιση (standard variation)

Min: ελάχιστη τιμή (minimum value)

Max: μέγιστη τιμή (maximum value)

* Έλαιο (που εκχυλίζεται με αιθέρα) (% ξ.β.)= 63,7- 0,82 (Ακατέργαστες πρωτεΐνες) (% ξ.β.)

*NDF (% ξ.β.)= 6,0+ 1,52 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

*ADF (% ξ.β.)= 3,4+ 1,18 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

*Λιγνίνη (% ξ.β.)= 2,1+ 0,47 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

Ερουκικό οξύ και γλυκοζινολιτικές ενώσεις

Οι ελαιούχοι σπόροι της ελαιοκράμβης συνήθως έχουν υψηλό ποσοστό ερουκικού οξέος και γλυκοζινολιτικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές έχει βρεθεί ότι προκαλούν προβλήματα υγείας στα ζώα, αλλά και τους ανθρώπους. Για αυτόν τον λόγο, από το 1970 οι ενώσεις αυτές εξαλείφθηκαν ή μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό μέσω γενετικών τροποποιήσεων της ελαιοκράμβης. Τα είδη της ελαιοκράμβης με χαμηλή συγκέντρωση σε ερουκικό οξύ στο κραμβέλαιο και σε γλυκοζινολιτικές ενώσεις στην πρωτεϊνική πίτα ονομάζονται double-low. Ο όρος canola επικρατεί στις Η.Π.Α. και την Αυστραλία για την ελαιοκράμβη με ποσοστό λιγότερο από 2% σε ερουκικό οξύ στο κραμβέλαιο και συγκέντρωση χαμηλότερη από 30 μmol/g σε γλυκοζινολιτικές ενώσεις στην πίτα. Το ερουκικό οξύ αποτελεί κύριο συστατικό του ελαίου της ελαιοκράμβης με ποσοστό έως 50%. Το ερουκικό οξύ δίνει πικρή γεύση και προκαλεί προβλήματα στην υγεία, για παράδειγμα προβλήματα στην καρδιά. Έτσι, από το 2005 το μεγαλύτερο ποσοστό ελαίου ελαιοκράμβης που παράγεται περιέχει ποσοστό ερουκικό οξέος χαμηλότερο από 2%. Ελαιοκράμβη με υψηλά ποσοστά ερουκικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία πολυμερών. Οι γλυκοζινολιτικές ενώσεις είναι γλυκοζίτες (υδατάνθρακες) υψηλής περιεκτικότητας σε θείο και βρίσκονται στα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*. Τα προϊόντα υδρόλυσής τους δίνουν μία πικρή και πικάντικη γεύση στην πρωτεϊνική πίτα που μειώνει την κατανάλωσή της από τα ζώα. Οι γλυκοζινολιτικές ενώσεις μπορεί να προκαλέσουν διαταραχές στο ήπαρ, τα νεφρά και τον θυρεοειδή αδέν. Οι πρωτεϊνικές πίτες προτείνεται να περιέχουν λιγότερο από 30 μmol γλυκοζινολιτικών ενώσεων/g ξηρής απειλαιωμένης πίτας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όπου αναφέρεται ο όρος ελαιοκράμβη θα εννοείται double-low ελαιοκράμβη (<2% ερουκικό οξύ και <30 μmol/g γλυκοζινολιτικές ενώσεις). (Gunstone, 2009, Heuze et al., 2019, Von Der Haar et al., 2014)

Λιπαρά οξέα

Το έλαιο της ελαιοκράμβης που αποτελεί το 45-50% των σπόρων της και είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.1. Συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από 60% ελαϊκό οξύ, 21% λινελαϊκό οξύ και 10% λινολενικό οξύ. Για αυτόν τον λόγο, το έλαιο της ελαιοκράμβης είναι πολύτιμο για τη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων και έτσι εκχυλίζεται. Η εκχύλιση του ελαίου δίνει ως παραπροϊόν πρωτεϊνικό άλευρο ή πίτα. Το άλευρο περιέχει περίπου 3% έλαιο. (Gunstone, 2009, Heuze et al., 2019)

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της ελαιοκράμβης είναι υψηλής ποιότητας και θρεπτικής αξίας. Περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που χρειάζονται τα ζώα, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.1., ενώ λειτουργούν και συμπληρωματικά με τις πρωτεΐνες της σόγιας. Συγκεκριμένα, περιέχουν αμινοξέα όπως κυστεΐνη και μεθειονίνη σε ισορροπημένη

αναλογία με τη λυσίνη, που δεν συμβαίνει στις περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες. Η λυσίνη είναι περιοριστικό αμινοξύ στα περισσότερα δημητριακά και στους περισσότερους ελαιούχους σπόρους, ενώ στην ελαιοκράμβη υπάρχει σε επαρκή ποσότητα. Οι πρωτεΐνες της ελαιοκράμβης είναι πιο σύνθετες από αυτές της σόγιας και αποτελούνται από σαράντα διαφορετικά πρωτεϊνικά κλάσματα που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία και μοριακά βάρη. Το γεγονός αυτό, όμως, δυσχεραίνει τη διεργασία της εκχύλισης των πρωτεϊνών. Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες του σπόρου της ελαιοκράμβης είναι οι εξής:

Η 12S γλοβουλίνη (σταυραντίνη) αποτελεί το 25-65% του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ελαιούχων σπόρων της ελαιοκράμβης. Είναι μία σφαιρική αποθηκευτική πρωτεΐνη, διαλυτή σε διαλύματα αλάτων, με μοριακό βάρος 300 kDa. Χωρίζεται σε έξι υπομονάδες (~50 kDa), η κάθε μία εκ των οποίων αποτελείται από μία α-αλυσίδα και μία β-αλυσίδα που ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό. Η δομή της προσομοιάζει τις αντίστοιχες γλοβουλίνες της σόγιας και του ηλιόσπορου. Το ισοηλεκτρικό σημείο της 12S γλοβουλίνης βρίσκεται σε ουδέτερο pH ίσο με 7,25.

Η 2S αλβουμίνη (ναπίνη) αποτελεί το 20-40% του πρωτεϊνικού περιεχομένου του σπόρου ελαιοκράμβης. Είναι μία σφαιρική αποθηκευτική πρωτεΐνη της ελαιοκράμβης, υδατοδιαλυτή και σταθερότερη από την 12S γλοβουλίνη. Έχει μοριακό βάρος 12-15 kDa και αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το ισοηλεκτρικό σημείο της είναι υψηλότερο από pH=10.

Οι ελαιοσίνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες των κυττάρων των σπόρων της ελαιοκράμβης. Αποτελούν το 6-8% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου και έχουν μοριακό βάρος 20 kDa. Είναι αδιάλυτες στο νερό λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους.

Άλλες πρωτεΐνες του ελαιούχου σπόρου της ελαιοκράμβης είναι πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και αναστολείς πρωτεάσης. (Dong et al., 2011, Fetzer et al., 2018, Von Der Haar et al., 2014, Wanasundara, 2011, Xu & Diosady, 2003)

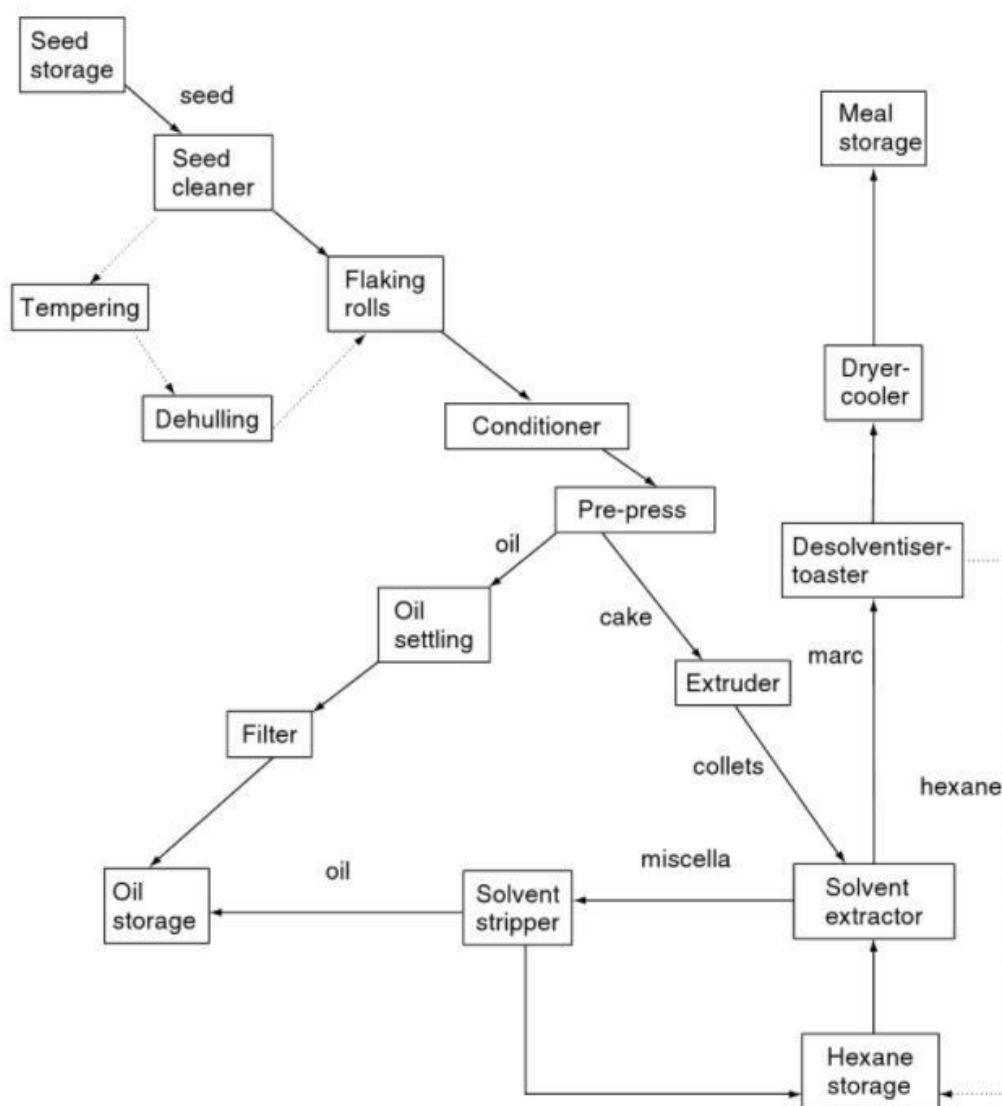
Δευτερογενείς μεταβολίτες

Εκτός από τις γλυκοζινολιτικές ενώσεις, που προαναφέρθηκαν, οι ελαιούχοι σπόροι της ελαιοκράμβης περιέχουν και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως φαινολικές ενώσεις, π.χ. ταννίνες, και φυτικό οξύ. Οι μεταβολίτες αυτοί μειώνουν τη θρεπτική αξία των σπόρων της ελαιοκράμβης και επιδεινώνουν τις λειτουργικές ιδιότητές τους. Οι φαινολικές ενώσεις και οι ταννίνες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των σπόρων και αποτελούν το 50% των δευτερογενών μεταβολιτών. Οι φαινολικές ενώσεις προκαλούν πικρή και στυφή γεύση και μετάγευση και δίνουν ένα σκούρο χρώμα στα προϊόντα. Οι ταννίνες είναι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζουν σύμπλοκα με διάφορα μόρια όπως οι πρωτεΐνες. Έτσι, οι πρωτεΐνες γίνονται λιγότερο εύπεπτες κατά τη διατροφή των ζώων. Στους ανοιχτότερους σπόρους της ελαιοκράμβης υπάρχει χαμηλότερο ποσοστό ταννινών. Από την άλλη, το φυτικό οξύ αποτελεί το 1-6% των σπόρων και συναντάται ως φυτικό ασβέστιο, μαγνήσιο ή κάλιο. Η ύπαρξη αυτών των

αλάτων του φυτικού οξέος μειώνει την απορρόφηση των ιχνοστοιχείων από τους οργανισμούς. Επιπλέον, τα άλατα του φυτικού οξέος δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες και ως εκ τούτου η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών μειώνεται. (Heuze et al., 2019, Von Der Haar et al., 2014, Wanasundara, 2011)

3.3 Βιομηχανική επεξεργασία ελαιοκράμβης

Η βιομηχανική επεξεργασία της ελαιοκράμβης αφορά την εκχύλιση του ελαίου από τους σπόρους της. Όπως προαναφέρθηκε, η ανάκτηση του ελαίου έχει ως σκοπό τη χρήση του στη διατροφή του ανθρώπου, αλλά και στην παραγωγή βιοντίζελ. Η εκχύλιση του ελαίου δίνει ως παραπροϊόν πρωτεϊνική πίτα με ποσοστό ελαίου ίσο με 3% και ποσοστό πρωτεϊνών ίσο με 35-40%. Η διεργασία εκχύλισης του ελαίου των ελαιούχων σπόρων της ελαιοκράμβης φαίνεται στο σχήμα 3.1. (Von Der Haar et al., 2014)



Σχήμα 3.1. Εκχύλιση ελαίου από σπόρους ελαιοκράμβης

Πηγή: Gunstone, 2009

Η διεργασία αυτή περιγράφηκε συνοπτικώς και στην παράγραφο 2.1 για την παραγωγή πρωτεϊνικού αλεύρου. Πιο συγκεκριμένα για την ελαιοκράμβη, τα βήματα προκατεργασίας των σπόρων, εκχύλισης του ελαίου και ανάκτησης του διαλύτη είναι τα εξής:

Καθαρισμός σπόρων (seed cleaning)

Οι ελαιούχοι σπόροι πρέπει να καθαρίζονται από ξένα υλικά όπως ανεπιθύμητα μέρη του φυτού, σπόροι ζιζανίων, άλλα σιτηρά, χώμα, σκόνη κλπ. Ο καθαρισμός γίνεται μέσω κοσκίνων με προσφύσηση αέρα από κάτω προς τα πάνω για διαχωρισμό μεγάλων σωματιδίων και μικρών σωματιδίων. Εν τέλει, οι προσμίξεις δεν ξεπερνούν το 2,5% του συνολικού ποσοστού των σπόρων της ελαιοκράμβης.

Θερμική κατεργασία (tempering)

Οι σπόροι θερμαίνονται σε θερμοκρασία 30-40 °C, ώστε να αποφευχθεί το θρυμματίσμα των φολιδών σε επόμενο στάδιο. Οι σπόροι που βρίσκονται σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να δημιουργήσουν φολίδες διάφορων μεγεθών που θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης εκχύλισης και τη περαιτέρω δυσκολία διαχωρισμού των λεπτών σωματιδίων. Κατά τη θερμική διεργασία μπορεί να εφαρμοστεί θερμό ρεύμα αέρα κατευθείαν στους σπόρους ή έμμεσα σε περιστροφικό κλίβανο. Απαιτείται χρόνος 30-45 min ήπιας θέρμανσης για ομοιόμορφη θέρμανση όλων των σπόρων της ελαιοκράμβης. Κατά τη θερμική κατεργασία μειώνεται η υγρασία των σπόρων μέσω της ροής θερμού αέρα έως ποσοστού υγρασίας 10,5-11%.

Αποφλοιώση (dehulling)

Η αποφλοιώση των σπόρων της ελαιοκράμβης πραγματοποιείται μέσω μηχανικού ή πνευματικού διαχωρισμού του φλοιού και φίλτρων εξαερισμού ή/και μηχανής διαλογής ρευστοποιημένης κλίνης. Η διεργασία αποφλοιώσης των σπόρων της ελαιοκράμβης είναι ακριβή λόγω του μικρού μεγέθους των σπόρων. Όμως με αποφλοιώση παράγεται πίτα μεγαλύτερου ποσοστού πρωτεϊνών και μικρότερου ποσοστού διαιτητικών ινών. Επίσης, κατά την αποφλοιώση, απομακρύνονται και μέρη φλοιών που μπορεί να έχουν προκύψει από τη θραύση των σπόρων.

Φολιδοποίηση (flaking)

Οι σπόροι φολιδοποιούνται ώστε να ακολουθήσει η εκχύλιση του ελαίου τους. Κατά τη φολιδοποίηση καταστρέφεται το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων των σπόρων. Τα μόρια των λιπιδίων διαχέονται σε όλο τον σπόρο και με αυτόν τον τρόπο οδηγούνται στην επιφάνεια των φολιδών. Έτσι, μπορούν να διαχωριστούν εύκολα από το στερεό υπόλειμμα του σπόρου. Η φολιδοποίηση των σπόρων δίνει τη δυνατότητα στον διαλύτη να εισχωρήσει στον σπόρο, που συμβαίνει σε επόμενο στάδιο. Οι φολίδες δημιουργούνται μέσω μηχανημάτων φολιδοποίησης. Οι φολίδες έχουν μεγάλη επιφάνεια και πάχος 0,20-0,38 mm. Μικρότερες φολίδες είναι εύθραυστες και δυσκολεύουν την εκχύλιση του ελαίου, ενώ μεγαλύτερες φολίδες μειώνουν την απόδοση της εκχύλισης.

Θερμική κατεργασία (conditioning/ cooking)

Σε αυτό το στάδιο θερμικής κατεργασίας ενισχύεται ο διαχωρισμός των σωματιδίων λιπιδίων μέσα στους σπόρους της ελαιοκράμβης. Σε θερμοκρασία 75-85 °C δημιουργούνται μεγαλύτερες σταγόνες ελαίου, μειώνεται το ιξώδες του ελαίου, μειώνεται το περιεχόμενο των σπόρων σε υγρασία και απενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα των σπόρων όπως ένζυμα υδρόλυσης των γλυκοζινολιτικών ενώσεων και λιπάσες.

Μηχανική εκχύλιση ελαίου (pre-pressing & extrusion)

Η μηχανική εκχύλιση του ελαίου αποσκοπεί στη δημιουργία συμπιεσμένης πίτας (press cake) ποιοτικά αποδεκτής, με ποσοστό ελαίου <20%. Η μηχανική εκχύλιση αποτελεί το πρώτο στάδιο εκχύλισης, ακολουθούμενη από εκχύλιση με χρήση διαλύτη στην οποία εκχυλίζεται το υπόλοιπο ποσοστό του ελαίου. Τα δύο στάδια εκχύλισης στοχεύουν στη μεγιστοποίηση του εκχυλιζόμενου ελαίου από τις φολίδες. Κατά τη μηχανική εκχύλιση οι φολίδες συμπιέζονται με χρήση πίεσης για να αυξηθεί η επαφή με το διαλύτη επόμενου σταδίου και επακολούθως ο βαθμός εκχύλισης. κατά τη μηχανική εκχύλιση δημιουργείται θερμότητα οπότε δεν απαιτείται επιπρόσθετη ενέργεια. Το βέλτιστο ποσοστό υγρασίας της συμπιεσμένης πίτας είναι ίσο με 4-5% και το βέλτιστο πάχος της πίτας είναι ίσο με 3,2-4,8 mm.

Η συμπιεσμένη πίτα ακολουθεί το στάδιο της εξώθησης (extrusion), κατά το οποίο το υλικό γίνεται πιο πορώδες, ώστε να διευκολυνθεί σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό η επακόλουθη εκχύλιση ελαίου με χρήση διαλύτη, διότι αυξάνεται η επιφάνεια επαφής του υλικού με τον διαλύτη. Κατά τη διαδικασία της εξώθησης, αυξάνεται η φαινόμενη πυκνότητα της πίτας, αυξάνεται η εκχυλισιμότητα του ελαίου, απομακρύνονται τα ελεύθερα λιπαρά οξέα από τη στερεή μήτρα και συσσωματώνονται οι πρωτεΐνες. Οι πόροι σχηματίζονται μέσω διαστολής του υλικού λόγω της ξαφνικής απελευθέρωσης της πίεσης, η οποία έχει δημιουργηθεί από ένα ρεύμα ατμού και από την τριβή του περιστρεφόμενου άξονα του εξωθητήρα. Αυτό το πορώδες υλικό ονομάζεται εξωθημένο προϊόν (collet), έχει ποσοστό ελαίου 15-18% και θερμοκρασία εξόδου 83-94 °C.

Καθίζηση και φιλτράρισμα ελαίου (oil settling and filtering)

Το έλαιο που προέρχεται από τη μηχανική εκχύλιση και την εξώθηση περιέχει ~3% στερεό υλικό. Το στερεό υλικό μπορεί να καθιζάνει μέσω βαρύτητας σε 3 h και σε θερμοκρασία 66 °C και μπορεί να συλλεχθεί και να ανακυκλωθεί ακολουθώντας το στάδιο της μηχανικής εκχύλισης. Το έλαιο, που προκύπτει μετά την καθίζηση των στερεών, φιλτράρεται ή φυγοκεντρείται για διαχωρισμό των μικρών στερεών σωματιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει το έλαιο το οποίο αποθηκεύεται.

Εκχύλιση με χρήση διαλύτη (solvent extraction)

Η συμπιεσμένη εξωθημένη πίτα ακολουθεί το στάδιο εκχύλισης με χρήση διαλύτη. Το στάδιο αυτό αποσκοπεί στην ανάκτηση μεγάλου μέρους του ελαίου, ελαχιστοποιώντας

τη χρήση του διαλύτη. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το n-εξάνιο, λόγω της διαθεσιμότητάς του, της καλής διαλυτότητας του ελαίου της πολύ μικρής διαλυτότητας στο νερό και του χαμηλού σημείου ζέσεως του. Από την άλλη, το n-εξάνιο εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα όπως υψηλή ευφλεκτικότητα και πτητικότητα και απαίτηση σε ακριβό εξοπλισμό και μεγάλα ποσά ενέργειας.

Κατά την εκχύλιση με διαλύτη, ο διαλύτης εισχωρεί στη συμπιεσμένη πίτα και διαλύει το εγκλωβισμένο έλαιο. Το έλαιο απομακρύνεται από το στερεό υλικό δημιουργώντας μικκύλια (miscella) μαζί με τον διαλύτη. Ο διαλύτης παρασύρει με διάφορους τρόπους τα μικκύλια εκχυλίζοντας το έλαιο. Οι εκχυλιστήρες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι συνεχείς και αντιστρόφου ροής. Η θερμοκρασία 50-55 °C βοηθά την εκχύλιση του ελαίου.

Ανάκτηση διαλύτη (solvent recovery)

Τα μικκύλια περιέχουν έλαιο σε ποσοστό 25% και διαλύτη. Το έλαιο πρέπει να απομακρυνθεί από τα μικκύλια, ώστε να αποθηκευτεί, αλλά και ο διαλύτης να επαναχρησιμοποιηθεί. Η απομάκρυνση αυτή γίνεται συνήθως μέσω κλασματικής απόσταξης (αποστακτική στήλη, τμήμα εξάντλησης διαλύτη-solvent stripper, συμπυκνωτήρας). Ο διαλύτης φιλτράρεται, ψύχεται και αποθηκεύεται για περαιτέρω χρήση. Οι απώλειες του διαλύτη υπολογίζονται μόλις σε 3,0 L/ tn ελαιοκράμβης.

Απομάκρυνση διαλύτη-Φρυγάνισμα (desolventising-toasting)

Η απειλωμένη πίτα που προκύπτει από την εκχύλιση με διαλύτη, περιέχει 30-35% διαλύτη. Ο διαλύτης αυτός πρέπει να απομακρυνθεί, ώστε η πίτα να είναι βρώσιμη. Η απομάκρυνση γίνεται μέσω εξάτμισης, ενώ η πίτα ταυτόχρονα ξηραίνεται και φρυγανίζεται. Η πίτα έχει αρχική θερμοκρασία 57 °C και θερμαίνεται με ρεύμα αέρα έως 105 °C. Έτσι ο διαλύτης εξατμίζεται, ακόμα και αν έχει απορροφηθεί από τις πρωτεΐνες, και αποθηκεύεται για περαιτέρω χρήση. Επίσης, απενεργοποιούνται μέσω του φρυγανίσματος διάφορα ανεπιθύμητα ένζυμα και αναστολείς, όπως αναστολείς τρυψίνης.

Έπειτα, η πίτα ξηραίνεται σε θερμοκρασία ~100 °C και υγρασία 10-12%. Η απειλωμένη πίτα έχει υγρασία 15-18% και περιεχόμενο σε έλαιο ~1%. Στο τέλος, η πίτα ξηραίνεται έως υγρασίας 8-10%, ψύχεται και αλέθεται, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή. Το παραπροϊόν της πίτας αποτελεί το 60% της αρχικής πρώτης ύλης.

Το έλαιο που προκύπτει από την παραπάνω διεργασία περιέχει κατά 98% τριγλυκερίδια και εστέρες, οπότε εξευγενίζεται για να μετατραπεί σε εδώδιμο. Το έλαιο αποτελεί το 39% της αρχικής πρώτης ύλης. (Gunstone, 2009, Wanasundara, 2011)

3.4 Πρωτεϊνική πίτα ελαιοκράμβης (παραπροϊόν)

Σημαντικό παραπροϊόν της εκχύλισης του κραμβέλαιου αποτελεί η απειλωμένη πρωτεϊνική πίτα της ελαιοκράμβης. Όπως προαναφέρθηκε, η πίτα αποτελεί το 60% της αρχικής πρώτης ύλης και περιέχει υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η πίτα

ελαιοκράμβης περιέχει 35-40% πρωτεΐνες. Εκτός από τις πρωτεΐνες, περιέχει περίπου 3% έλαιο, υδατάνθρακες (30-35%), διαιτητικές ίνες (10-15%), ιχνοστοιχεία (5-10%) και δευτερογενείς μεταβολίτες (έως 10%). Πιο αναλυτικά, η σύσταση της πίτας ελαιοκράμβης παρατίθεται στον πίνακα 3.2. (Gunstone, 2009, Von Der Haar et al., 2014, Yu et al., 2015)

Πίνακας 3.2. Σύσταση πίτας ελαιοκράμβης (έλαιο <5%, μετά από εκχύλιση του κραμβέλαιου)

Προέλευση: Heuze et al., 2020, μετά από προσαρμογή

Κύρια ανάλυση	Μονάδα μέτρησης	Avg	SD	Min	Max	Αριθμός τιμών/δειγμάτων
Ξηρή βάση	% τροφοδοσίας	89	0,9	84,3	94,5	7.005
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	% ξ.β.	38,1	1,3	32,6	44,8	7.056
Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες	% ξ.β.	14,3	1,2	8,6	18,1	6.136
NDF*	% ξ.β.	31,6	3,5	20,5	41,6	241**
ADF*	% ξ.β.	20,7	1,6	16,8	26,6	239**
Λιγνίνη*	% ξ.β.	9,7	1,2	7,1	13,8	285**
Έλαιο (που εκχυλίζεται με αιθέρα)*	% ξ.β.	2,4	0,7	0,3	5,7	5.758
Τέφρα	% ξ.β.	7,6	0,4	6,5	10,4	1.164
Άμυλο (πολωσιμετρικά)	% ξ.β.	6,3	1,6	0,6	8,1	99
Άμυλο (ενζυμικά)	% ξ.β.	1,6		1,3	1,8	2
Ολικά σάκχαρα	% ξ.β.	10,5	0,9	8,2	13,6	80
Ολική ενέργεια τροφής	MJ/kg ξ.β.	19,3	0,4	18,3	20	28**
Αμινοξέα						
Αλανίνη	g/16 g N	4,3	0,1	3,8	4,6	77**
Αργινίνη	g/16 g N	5,8	0,3	5	6,4	129**
Ασπαραγινικό οξύ	g/16 g N	7,1	0,3	6,2	8,1	78**
Κυστεΐνη	g/16 g N	2,4	0,1	1,8	2,6	130**
Γλουταμινικό οξύ	g/16 g N	17	0,9	14,9	21,1	78**
Γλυκίνη	g/16 g N	5	0,2	4,4	5,3	77**
Ιστιδίνη	g/16 g N	2,7	0,08	2,4	2,9	130**
Ισολευκίνη	g/16 g N	4	0,08	3,7	4,3	130**
Λευκίνη	g/16 g N	6,8	0,1	6,6	7,5	130**
Λυσίνη	g/16 g N	5,3	0,3	3,8	6,2	247**
Μεθειονίνη	g/16 g N	2	0,07	1,8	2,2	127**
Μεθειονίνη+ Κυστεΐνη	g/16 g N	4,4	0,1	4	4,7	129**
Φαινυλαλανίνη	g/16 g N	3,9	0,1	3,4	4,3	130**

Φαινυλαλανίνη+ Τυροσίνη	g/16 g N	6,7	0,2	6,2	7,5	56**
Προλίνη	g/16 g N	6	0,3	5,3	7	68**
Σερίνη	g/16 g N	4,4	0,2	3,9	4,9	77**
Θρεονίνη	g/16 g N	4,3	0,2	3,8	4,8	83**
Τρυπτοφάνη	g/16 g N	1,2	0,1	1,1	1,7	65**
Τυροσίνη	g/16 g N	2,8	0,2	2,3	3,4	64**
Βαλίνη	g/16 g N	5,1	0,1	4,7	5,5	129**
Λιπαρά οξέα						
Μυριστικό οξύ C 14:0	% λιπαρών οξέων	0,03	0,05	0	0,2	61
Παλμιτικό οξύ C 16:0	% λιπαρών οξέων	4,7	0,9	3,9	11,5	78
Παλμιτελαϊκό οξύ C 16:1	% λιπαρών οξέων	0,2	0,09	0	0,4	63
Στεατικό οξύ C 18:0	% λιπαρών οξέων	1,6	0,3	1,4	3,6	78
Ελαϊκό οξύ C 18:1	% λιπαρών οξέων	60,4	2,7	43,6	64,2	78
Λινελαϊκό οξύ C 18:2	% λιπαρών οξέων	20	1,4	17,3	24,9	81
Λινολενικό οξύ C 18:3	% λιπαρών οξέων	9,2	1,9	1,2	12,5	77
Ιχνοστοιχεία						
Ασβέστιο	g/kg ξ.β.	8,6	1	5,1	11,3	433
Φωσφόρος	g/kg ξ.β.	12,7	1	10,2	20,8	511
Κάλιο	g/kg ξ.β.	14,1				
Νάτριο	g/kg ξ.β.	0,29				
Χλώριο	g/kg ξ.β.	0,7				
Μαγνήσιο	g/kg ξ.β.	4,6		3,1	5,4	4
Θείο	g/kg ξ.β.	8,3				1
Μαγγάνιο	mg/kg ξ.β.	68	11	49	86	10
Ψευδάργυρος	mg/kg ξ.β.	78	25	56	142	18
Χαλκός	mg/kg ξ.β.	9	7	2	25	17
Σίδηρος	mg/kg ξ.β.	183	36	110	202	5
Σελήνιο	mg/kg ξ.β.	1				

NDF: Συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (ημικυτταρίνη, κυτταρίνη και λιγνίνη) (neutral detergent fiber)

ADF: Λιγότερο εύπεπτα συστατικά (κυτταρίνη και λιγνίνη) (acid detergent fiber)

Avg: Μέση ή προβλεπόμενη τιμή (average or predicted value)

SD: τυπική απόκλιση (standard variation)

Min: ελάχιστη τιμή (minimum value)

Max: μέγιστη τιμή (maximum value)

* Έλαιο (που εκχυλίζεται με αιθέρα) (% ξ.β.)= 63,7- 0,82 (Ακατέργαστες πρωτεΐνες) (% ξ.β.)

*NDF (% ξ.β.)= 6,0+ 1,52 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

*ADF (% ξ.β.)= 3,4+ 1,18 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

*Λιγνίνη (% ξ.β.)= 2,1+ 0,47 (Ακατέργαστες διαιτητικές ίνες) (% ξ.β.)

****Η μέση τιμή προκύπτει μέσω εξίσωσης**

Η πρωτεϊνική πίτα της ελαιοκράμβης χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε ζωοτροφές, αφού παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και είναι φθηνή. Από την άλλη, για την πίτα υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον και για την ανάκτηση των πρωτεϊνών, λόγω του υψηλού περιεχομένου της σε αυτές. Εκτός αυτού, οι πρωτεΐνες της πίτας έχουν ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων, είναι υψηλής ποιότητας και θρεπτικής αξίας και περιέχουν ικανοποιητικά ποσοστά λυσίνης που είναι περιοριστικό αμινοξύ στα περισσότερα δημητριακά και τους ελαιούχους σπόρους, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Επίσης, η χρήση πρωτεϊνών ελαιοκράμβης σε διάφορα τρόφιμα αυξάνει την αφριστική και τη γαλακτωματοποιητική ικανότητά τους. Λόγω των παραπάνω, η ελαιοκράμβη μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στην ολοένα και αυξανόμενη ανάγκη για πρωτεΐνες, εξαιτίας της διαρκούς αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού. Η παραλαβή πρωτεϊνών από την πίτα ελαιοκράμβης με τη μορφή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων ή υπερσυμπυκνωμάτων μπορεί να γίνει με συμβατική εκχύλιση ή εκχύλιση με νέες μεθόδους π.χ. με μικροκύματα, υπέρηχους, μέθοδοι που έχουν αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η παραλαβή πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη μελετάται συνεχώς από πολλούς ερευνητές. Μειονέκτημα, όμως, των πρωτεϊνικών προϊόντων της ελαιοκράμβης είναι το ανεπιθύμητο σκούρο πράσινο χρώμα και η πικρή γεύση τους, εξαιτίας των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν. Για αυτόν τον λόγο, οι έρευνες πάνω στις πρωτεΐνες της ελαιοκράμβης έχουν καθυστερήσει. (Fetzer et al., 2018, Xu & Diosady, 2003, Yu et al., 2015)

Κεφάλαιο 4 Πειραματικό Μέρος

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της εκχύλισης πρωτεϊνών από πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης με νέες μεθόδους εκχύλισης, πέρα της συμβατικής. Τέτοιες μέθοδοι είναι η μέθοδος της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, της εκχύλισης υποβοηθούμενης από ένζυμα και της εκχύλισης με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών ακολουθείται από την καταβύθισή τους στο ισοηλεκτρικό τους σημείο και την παραλαβή του πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος. Σκοπός αποτελεί η εύρεση της μέγιστης απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών, της ολικής απόδοσης της διεργασίας και του μέγιστου περιεχομένου του πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος μέσω της βελτιστοποίησης ορισμένων συνθηκών εκχύλισης. Συγκεκριμένα, εξετάζεται το στάδιο της εκχύλισης ως προς τον χρόνο, το pH, τη θερμοκρασία και τον λόγο στερεού/υγρό. Επιπροσθέτως, εξετάζεται η ισχύς των μικροκυμάτων και το είδος του ενζύμου στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και ένζυμα αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα μελετάται η επίδραση της ύπαρξης ή μη ελαίου στην πρώτη ύλη και η επίδραση ενός σταδίου θερμικής προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης πριν το στάδιο της εκχύλισης. Τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα μελετώνται και ποιοτικά ως προς τις λειτουργικές ικανότητές τους να απορροφούν νερό και έλαιο. Τέλος, συγκρίνονται οι μέθοδοι μεταξύ τους αξιολογώντας στατιστικά τα επιμέρους αποτελέσματα.

4.2 Πρώτες ύλες και Αντιδραστήρια

Ως πρώτη ύλη της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιείται πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης που προμηθεύτηκε από τη <<ΣΟΓΙΑ ΕΛΛΑΣ Α.Ε.>> (Ψαχνά Ευβοίας). Το άλευρο ελαιοκράμβης αποτελεί παραπροϊόν της παραγωγής κραμβέλαιου της εταιρείας. Το πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης αλέθεται σε μέγεθος 0,5 mm και μέρος του απελαιώνεται με πετρελαϊκό αιθέρα (Carlo Erba Reagents S.A.S.) σε συσκευή Soxhlet. Το απελαιωμένο και μη απελαιωμένο πρωτεϊνικό άλευρο φυλάσσονται σε δροσερό και σκιερό μέρος και αποτελούν την πρώτη ύλη για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και την παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων.

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου NaOH (Carlo Erba Reagents S.A.S.) και θεικού οξέος H₂SO₄ (Panreac Quimica S.A.) συγκέντρωσης 0,5 N για τη ρύθμιση του pH. Κατά την ισοηλεκτρική καταβύθιση και τον προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου χρησιμοποιούνται διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου NaOH και υδροχλωρίου HCl (Carlo Erba Reagents S.A.S.) συγκέντρωσης 0,5 N για τη ρύθμιση του pH.

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου Kjeldahl, δηλαδή κατά την εύρεση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες της πρώτης ύλης και των διάφορων πρωτεϊνικών προϊόντων, χρησιμοποιούνται θειικό κάλιο K₂SO₄ (Carl Roth GmbH & Co. Kg), ένυδρος θειικός χαλκός CuSO₄·5H₂O (Panreac Quimica S.A), πυρήνες βρασμού

(Merck Millipore), διάλυμα πυκνού θειϊκού οξέος 95-98% H₂SO₄ (Fisher), διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου NaOH 32% w/w παρασκευασμένο από φυλλίδια στερεού NaOH, απιονισμένο νερό προερχόμενο από τη στήλη παραγωγής απιονισμένου νερού του εργαστηρίου και διάλυμα θειϊκού οξέος H₂SO₄ συγκέντρωσης 0,5 N (Panreac Quimica S.A.). Για την τιτλοδότηση χρησιμοποιείται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου NaOH (Carlo Erba Reagents S.A.S.) συγκέντρωσης 0,5 N και δείκτης ερυθρό μεθυλίου-μπλε μεθυλενίου, ο οποίος παρασκευάζεται με προσθήκη 0,125 g ερυθρό μεθυλίου και 0,08 g μπλε μεθυλενίου σε 100 mL αιθανόλης.

Κατά τη μέτρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων και ειδικότερα της ικανότητας απορρόφησης νερού και της ικανότητας απορρόφησης ελαίου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό προερχόμενο από τη στήλη παραγωγής απιονισμένου νερού του εργαστηρίου και αραβοσιτέλαιο (Vita D'or).

Για την παρασκευή του ευτηκτικού διαλύτη χρησιμοποιείται κιτρικό οξύ (Chemco) και D-γλυκόζη (Acros Organics), ενώ κατά την ενζυμική κατεργασία της πρώτης ύλης χρησιμοποιείται κυτταρινολυτικό μείγμα ενζύμων Cellic Ctec2 (SigmaAldrich) και ημικυτταρινολυτικό μείγμα ενζύμων Cellic Htec (SigmaAldrich). Για την παρασκευή του κιτρικού-φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH=5.0 /50 mM χρησιμοποιούνται κιτρικό οξύ 0,1 M (SigmaAldrich) και όξινο φωσφορικό νάτριο Na₂HPO₄ 0,2 M (SigmaAldrich).

4.3 Συσκευές και Όργανα

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές και όργανα:

- Φυγοκεντρικός μύλος Retsch
- Αναλυτικός ζυγός Precisa XT 220A, 4 δεκαδικών ψηφίων
- Αναλυτικός ζυγός Kern 572, 2 δεκαδικών ψηφίων
- Φούρνοι Binder
- Γυάλινος ξηραντήρας με silica gel
- Υδατόλουτρο HAAKE G με θερμοαντήρα HAAKE D3
- Αναδευτήρας R 18 CAT
- Φορητό πεχάμετρο WTW pH 315i
- Φυγόκεντρος MLW T 54
- Φυγόκεντρος Hettich ROTANTA 460 R
- Θολόμετρο HACH 2100N Turbidimeter
- Συσκευή καύσης Kjeldahl BÜCHI 425 Digestor
- Συσκευή απόσταξης Kjeldahl BÜCHI Distillation Unit K-350
- Μαγνητικός αναδευτήρας AGE
- Καταψύκτης Whirlpool
- Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη CHRIST Alpha 1-4 LD plus
- Αναδευτήρας Vortex VELP scientifica
- Φυγόκεντρος Hettich Universal II

- Συσκευή Soxhlet
- Φούρνος μικροκυμάτων SHARP
- Ψυγείο PITSOS Mediterranée
- Ποτήρια ζέσεως, σφαιρικές φιάλες, κωνικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, σωλήνες φυγοκέντρου, βαθμονομημένοι σωλήνες φυγοκέντρου, προχοϊδες, σιφόνια, φιάλες Kjeldahl
- Πουάρ τριών βαλβίδων
- Πλαστικά τρυβλία, αλουμινόχαρτο
- Μεταλλική σπαθίδα
- Σταγονόμετρο
- Μαγνήτης ανάδευσης

4.4 Πειραματική διαδικασία

4.4.1 Προκατεργασία αλεύρου

Άλεση

Το πρωτεϊνικό αλεύρο της ελαιοκράμβης που αποτελεί την πρώτη ύλη αλέθεται σε μύλο έως ότου η διάμετρος των σωματιδίων να είναι ίση με 0,5 mm. Το αλεσμένο αλεύρο κοσκινίζεται για να προκύψει αλεύρο ομοιόμορφου μεγέθους σωματιδίων και φυλάσσεται σε δροσερό και σκιερό μέρος. Αυτό χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl.

Απελαίωση

Σε μέρος της πρώτης ύλης πραγματοποιείται απελαίωση αν και το πρωτεϊνικό αλεύρο ελαιοκράμβης που παραλήφθηκε έχει υποστεί βιομηχανική απελαίωση. Η διπλή απελαίωση (βιομηχανική και εργαστηριακή) μελετάται διότι προκύπτει δυσκολία στο μετέπειτα στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παράγεται μικρή ποσότητα των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Η απελαίωση πραγματοποιείται ώστε να μην παρεμποδίζεται η εκχύλιση των πρωτεϊνών από τα μόρια του ελαίου.

Αρχικά, δύο δείγματα ορισμένης ποσότητας της πρώτης ύλης ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g και φέρονται σε καρτούσες, ενώ τοποθετείται πάνω τους βαμβάκι. Οι καρτούσες τοποθετούνται σε συσκευή Soxhlet, ενώ πετρελαϊκός αιθέρας 300 mL τοποθετείται σε δύο σφαιρικές φιάλες ως διαλύτης. Οι φιάλες τοποθετούνται πάνω στον θερμαινόμενο μανδύα της συσκευής. Έπειτα, ρυθμίζεται η ένταση της θέρμανσης και η παροχή του νερού. Η πρώτη ύλη αφήνεται να απελαιωθεί για 2 h από την παρατήρηση του πρώτου σιφωνισμού. Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του ελαίου από το αλεύρο της ελαιοκράμβης, ο διαλύτης χρωματίζεται από το έλαιο. Στο τέλος της απελαίωσης κλείνει η παροχή του νερού, σταματά η θέρμανση και η συσκευή αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Η απελαιωμένη πρώτη ύλη συλλέγεται από την καρτούσα, αφήνεται να ψυχθεί στον ξηραντήρα και στη συνέχεια τοποθετείται σε συνθήκες

περιβάλλοντος κατά τις οποίες πραγματοποιείται εξάτμιση του υπολειπόμενου πετρελαϊκού αιθέρα.

Θερμική προκατεργασία

Λόγω του προβλήματος της παραγωγής μικρής ποσότητας των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων προτείνονται δύο στάδια προκατεργασίας τα οποία μελετώνται ξεχωριστά. Το πρώτο αφορά τη θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης που έχει ως στόχο την αύξηση του ποσοστού της απομάκρυνσης του διαλύτη, δηλαδή του νερού, μαζί με τις πρωτεΐνες από τα φυτικά κύτταρα της ελαιοκράμβης. Το δεύτερο στάδιο αφορά την ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης που έχει ως σκοπό την ενζυμική κατάλυση της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων της ελαιοκράμβης.

Κατά τη θερμική προκατεργασία, μέρος της πρώτης ύλης θερμαίνεται στον φούρνο Binder σε θερμοκρασία 50 °C για 2 h και έπειτα αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία δωματίου.

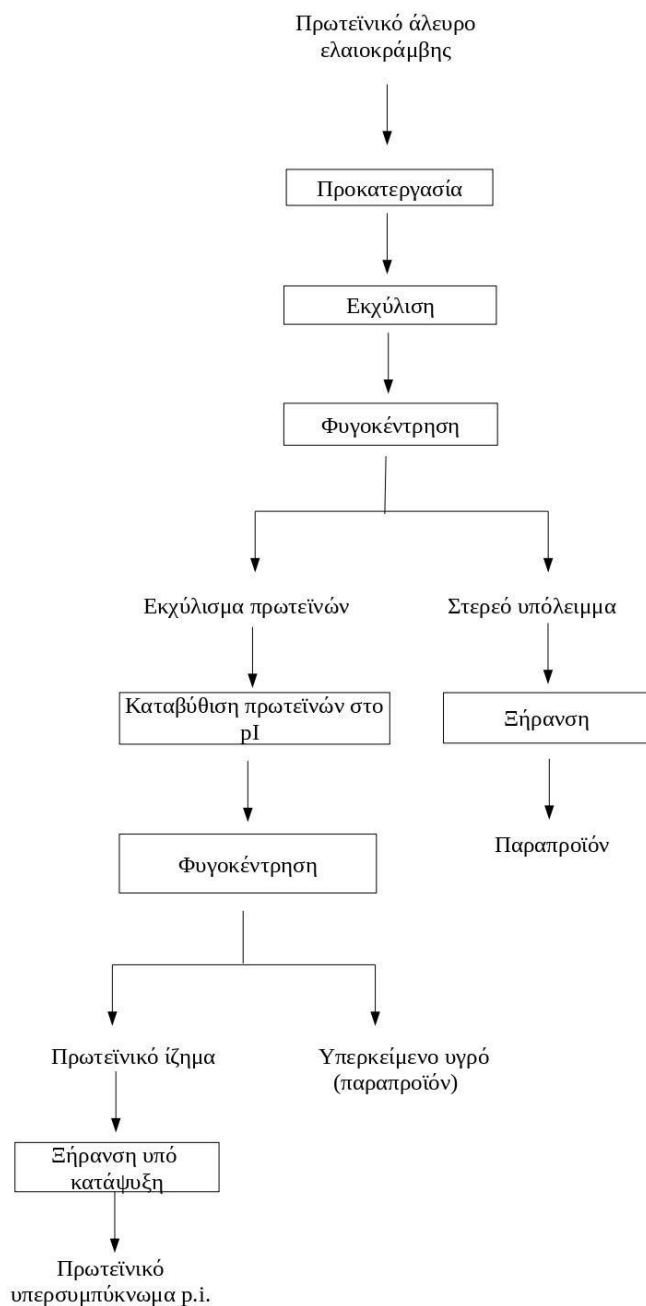
Ενζυμική προκατεργασία

Κατά την ενζυμική προκατεργασία χρησιμοποιούνται τρία ενζυμικά μείγματα. Το πρώτο μείγμα αποτελεί ένα κυτταρινολυτικό μείγμα ενζύμων Cellic Ctec2 σε ποσοστό 3% w/w σε σχέση με την πρώτη ύλη. Δηλαδή, για 40 g πρώτης ύλης χρησιμοποιούνται 1,2 g ενζύμου. Το δεύτερο μείγμα ενζύμων αποτελεί ένα ημικυτταρινολυτικό μείγμα ενζύμων Cellic Htec σε ποσοστό 3% w/w σε σχέση με την πρώτη ύλη. Δηλαδή, για 40 g πρώτης ύλης χρησιμοποιούνται 1,2 g ενζύμου. Το τρίτο μείγμα ενζύμων αποτελεί ένα κυτταρινολυτικό και ημικυτταρινολυτικό μείγμα ενζύμων σε ποσοστό Cellic Ctec2 2,7% και Cellic Htec 0,3%, αντίστοιχα. Για 40 g πρώτης ύλης χρησιμοποιούνται 1,08 g Cellic Ctec2 και 0,12 g Htec. Κατά την ενζυμική προκατεργασία παρασκευάζεται και κιτρικό-φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, αναμειγνύονται 972 mL κιτρικού οξέος 0,1 M, 1,028 L όξινου φωσφορικού νατρίου 0,2 M και 2 L απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 5,0 αν χρειαστεί.

Για την ενζυμική προκατεργασία, αρχικά αναμειγνύονται 40 g αλεύρου ελαιοκράμβης, 1 L ρυθμιστικό διάλυμα και οι κατάλληλες ποσότητες ενζύμου που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Παρασκευάζεται και λευκό δείγμα που δεν περιέχει ένζυμο, αλλά μόνο άλευρο και ρυθμιστικό διάλυμα. Το μείγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 50 °C υπό ανάδευση για 2 h. Έπειτα το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται σε 2600xg για 20 min. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει, αφού ψυχθεί στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C για 2 d, αποτελεί την ενζυμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη που θα ακολουθήσει το στάδιο της εκχύλισης.

4.4.2 Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων

Η παραλαβή των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων παρουσιάζεται στο σχήμα 4.1. Τα κύρια στάδια που πραγματοποιούνται είναι το στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών.



Σχήμα 4.1. Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας

Εκχύλιση πρωτεϊνών

Κατά την εκχύλιση των πρωτεϊνών, πρώτη ύλη (άλευρο ελαιοκράμβης, απελαιωμένο άλευρο ελαιοκράμβης, θερμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης ή ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης) ίση με ποσότητα 20 g ζυγισμένη με ακρίβεια

0,001 g και κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού φέρονται σε ποτήρι ζέσεως 500 mL, το οποίο τοποθετείται σε υδατόλουτρο. Το υδατόλουτρο θερμαίνεται με τη βοήθεια θερμαντήρα σε κατάλληλη και σταθερή θερμοκρασία και το μείγμα αναδεύεται συνεχώς. Ταυτόχρονα, το pH ρυθμίζεται με πεχάμετρο σε κατάλληλη τιμή με χρήση υδατικού διαλύματος NaOH και H₂SO₄ 0,5 N. Μετά το πέρας 30 min, η διαδικασία της συμβατικής εκχύλισης λαμβάνει τέλος. Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, το ποτήρι ζέσεως με την πρώτη ύλη και την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για συγκεκριμένο χρόνο και συγκεκριμένη ισχύ μικροκυμάτων, ενώ το pH ρυθμίζεται σε κατάλληλη τιμή. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα διακόπτεται η εκχύλιση και το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί, ώστε να μην υπερβεί η θερμοκρασία τους 50 °C, και έπειτα η εκχύλιση συνεχίζεται. Μετά το στάδιο της συμβατικής εκχύλισης ή εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, το αιώρημα φυγοκεντρείται σε 2600xg για 20 min. Το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει, δηλαδή το εκχύλισμα των πρωτεϊνών, συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως, ενώ το στερεό υπόλειμμα ξηραίνεται στους 70 °C για 24 h, ζυγίζεται και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μη εκχυλισμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl.

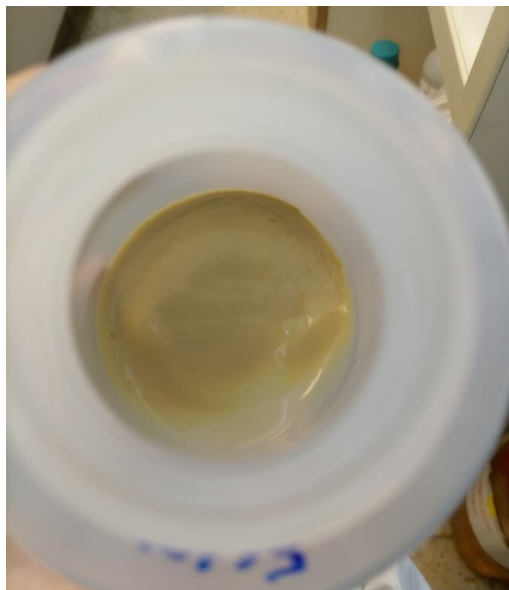
Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης, δηλαδή την τιμή pH στην οποία παρατηρείται μέγιστη καταβύθιση των πρωτεϊνών, οκτώ δείγματα 45 mL του εκχυλίσματος των πρωτεϊνών, το οποίο πρώτα έχει ογκομετρηθεί, φέρονται σε οκτώ ποτήρια ζέσεως των 100 mL. Σε κάθε ένα εκχύλισμα ρυθμίζεται το pH σε συγκεκριμένη τιμή με προσθήκη υδατικών διαλυμάτων NaOH και HCl 0,5 N, υπό ήπια ανάδευση, με τη χρήση πεχάμετρου. Οι τιμές pH που δοκιμάζονται είναι οι εξής: 3,00, 3,50, 4,00, 4,25, 4,50, 4,75, 5,00, 5,50. Αφού συμβεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών, ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 2600xg για 20 min. Στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει γίνεται μέτρηση της θολότητας, ενώ ζυγίζεται και η μάζα των πρωτεϊνικών ιζημάτων, δηλαδή των καταβυθισμένων πρωτεϊνών, αφού υποστούν ξήρανση υπό κατάψυξη για 48 h. Σε όποια τιμή pH υπάρχει μικρότερη θολότητα του υπερκείμενου υγρού και μεγαλύτερη μάζα του καταβυθισμένων πρωτεϊνών, αυτή η τιμή αποτελεί το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης.

Ισοηλεκτρική καταβύθιση πρωτεϊνών

Κατά την ισοηλεκτρική καταβύθιση των πρωτεϊνών, στο εκχύλισμα των πρωτεϊνών που έχει συλλεχθεί σε ποτήρι ζέσεως γίνεται η ρύθμιση στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 2600xg για 20 min και το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει αποχύνεται. Το ίζημα που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση περιέχει τις καταβυθισμένες πρωτεΐνες και μεταφέρεται, με όσον το δυνατόν μικρότερη ποσότητα νερού, σε προζυγισμένο πλαστικό τρυβλίο, ξηραίνεται υπό κατάψυξη για 48 h και ζυγίζεται. Έτσι προκύπτει το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των

καταβυθισμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl και για τον προσδιορισμό της ικανότητας απορρόφησης νερού και της ικανότητας απορρόφησης ελαίου.



Σχήμα 4.2. Πρωτεϊνικό ίζημα ελαιοκράμβης που περιέχει τις καταβυθισμένες πρωτεΐνες

Παρασκευή του ευτηκτικού διαλύτη

Κατά την παρασκευή του ευτηκτικού διαλύτη, 210 g κιτρικού οξέος και 198 g γλυκόζης (αναλογία mol 1:1) φέρονται σε ποτήρι ζέσεως και αναδεύονται υπό θέρμανση σε θερμοκρασία 80 °C έως ότου δημιουργηθεί ένα ομοιόμορφο υγρό διάλυμα. Τότε, γίνεται προσθήκη 45% v/v απιονισμένου νερού. Ο ευτηκτικός διαλύτης που προκύπτει χρησιμοποιείται ως διαλύτης για την εκχύλιση των πρωτεϊνών, στην οποία το pH διατηρείται στην όξινη περιοχή λόγω της δυσκολίας προσαρμογής του στη βασική περιοχή.

4.5 Αναλύσεις- Μετρήσεις

4.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Δείγμα 2 g ζυγισμένα με ακρίβεια 0,001 g προζυγίζονται και οδηγούνται για ξήρανση στους 110 °C για 24 h. Έπειτα, τοποθετούνται σε ξηραντήρα για 15 min και ακολουθεί ζύγιση. Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα σε υγρασία υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Υγρασία (\%)} = \frac{\text{Απώλεια βάρους (g)}}{\text{Αρχικό βάρος δείγματος (g)}} \cdot 100\% \text{ (εξίσωση 14)}$$

4.5.2 Προσδιορισμός ελαίου

Ορισμένη ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε συσκευή Soxhlet και υφίσταται απελαίωση, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη παράγραφο. Μετά τη διαδικασία της απελαίωσης και αφού έχει γίνει η απομάκρυνση του διαλύτη, το δείγμα υφίσταται ξήρανση σε θερμοκρασία 45 °C για 24 h. Έπειτα, αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα

και ζυγίζεται. Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα του δείγματος σε έλαιο υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Έλαιο (\%)} = \frac{\text{Βάρος ελαίου (g)}}{\text{Αρχικό βάρος δείγματος (g)}} \cdot 100\% \text{ (εξίσωση 15)}$$

4.5.3 Προσδιορισμός αζώτου (πρωτεϊνών)- Μέθοδος Kjeldahl

Με τη μέθοδο Kjeldahl γίνεται εύρεση του ποσοστού του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου σε δείγματα της πρώτης ύλης, του στερεού υπολείμματος που προκύπτει ύστερα από την πρώτη φυγοκέντρηση και του πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος. Σε ειδική φιάλη Kjeldahl φέρεται ορισμένη ποσότητα δείγματος (1-1,5 g για την πρώτη ύλη, 1,5-2 g για το στερεό υπόλειμμα και 1 g για το πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα) ζυγισμένη με ακρίβεια 0,001 g, 10 g θεικού καλίου, 1 g ένυδρου θεικού χαλκού, 25 mL πυκνού θεικού οξέος και πυρήνες βρασμού. Η φιάλη τοποθετείται στη συσκευή καύσης Kjeldahl στην οποία τοποθετείται και ψυκτήρας για δημιουργία κενού. Αρχικά η θέρμανση παραμένει ήπια για 20 min μέχρι να ξεκινήσει ο αφρισμός, έπειτα αυξάνεται μέχρι να γίνει διαύγαση του περιεχομένου για 15 min και τέλος αυξάνεται περαιτέρω φτάνοντας τη μέγιστη θερμοκρασία μέχρι να επέλθει έντονος βρασμός διάρκειας 30 min. Η φιάλη αφήνεται να ψυχθεί και οδηγείται στη συσκευή απόσταξης Kjeldahl. Εκεί προστίθενται στη φιάλη 75 mL απιονισμένο νερό και 125 mL διαλύματος NaOH 32% w/w, ενώ το απόσταγμα συλλέγεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 50 mL διαλύματος θεικού οξέος 0,5 N. Όταν γίνει συλλογή 200 mL αποστάγματος, το υπολειπόμενο θεικό οξύ τιτλοδοτείται με διάλυμα NaOH 0,5 N και δείκτη ερυθρό μεθυλίου-μπλε μεθυλενίου. Να σημειωθεί ότι πραγματοποιείται και λευκός προσδιορισμός. Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα του δείγματος από οργανικό άζωτο υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Άζωτο (\%)} = 1,4007 \cdot |V1 - V2| \cdot N/\beta \text{ (εξίσωση 16)}$$

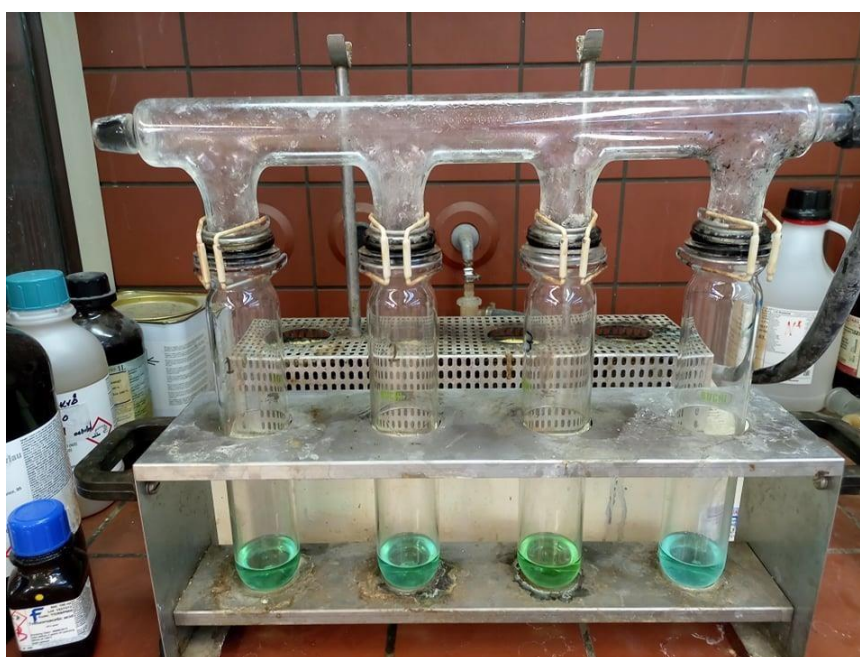
όπου V1 και V2 οι καταναλωθέντες όγκοι του πρότυπου διαλύματος καυστικού νατρίου κατά τον κυρίως και λευκό προσδιορισμό, αντίστοιχα, N η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος καυστικού νατρίου (=0,5 N) και β το βάρος του δείγματος.

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνες υπολογίζεται έμμεσα ως εξής:

$$\text{Πρωτεΐνες (\%)} = \text{Άζωτο(\%)} \cdot 6,25 \text{ (εξίσωση 17)}$$



Σχήμα 4.3. Φιάλες Kjeldahl κατά τη διάρκεια της καύσης



Σχήμα 4.4. Φιάλες Kjeldahl στο τέλος της καύσης



Σχήμα 4.5. Συσκευή απόσταξης Kjeldahl

4.5.4 Προσδιορισμός αποδόσεων

Αν θεωρήσουμε ότι M : μάζα πρώτης ύλης που περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό α % (ξ.β.), m : μάζα στερεού υπολείμματος που περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό β % (ξ.β.) και μ : μάζα πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος που περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό γ % (ξ.β.), τότε:

$$\text{Αρχικές πρωτεΐνες} = \frac{\alpha M}{100} \text{ (εξίσωση 18)}$$

$$\text{Μη εκχυλισμένες πρωτεΐνες} = \frac{\beta m}{100} \text{ (εξίσωση 19)}$$

$$\text{Εκχυλισμένες πρωτεΐνες} = \frac{\alpha M}{100} - \frac{\beta m}{100} \text{ (εξίσωση 20)}$$

$$\text{Παραλαμβανόμενες (καταβυθισμένες) πρωτεΐνες} = \frac{\gamma \mu}{100} \text{ (εξίσωση 21)}$$

$$\text{Απόδοση εκχύλισης \%} = \frac{\frac{\alpha M - \beta m}{100}}{\frac{\alpha M}{100}} 100\% \text{ (εξίσωση 22)}$$

$$\text{Απόδοση καταβύθισης \%} = \frac{\frac{\gamma \mu}{100}}{\frac{\alpha M - \beta m}{100}} 100\% \text{ (εξίσωση 23)}$$

$$\text{Ολική απόδοση \%} = \frac{\frac{\gamma \mu}{100}}{\frac{\alpha M}{100}} 100\% \text{ (εξίσωση 24)}$$

4.5.5 Μέτρηση λειτουργικών ιδιοτήτων

Ικανότητα απορρόφησης νερού (IAN)

Ποσότητα δείγματος ίση με 0,25 g ζυγισμένη με ακρίβεια 0,0001 g φέρεται σε προζυγισμένο βαθμονομημένο σωλήνα φυγοκέντρου όγκου 12 mL στον οποίο προστίθενται 5 mL απιονισμένου νερού. Ο σωλήνας αναδεύεται σε αναδευτήρα Vortex μέχρι να γίνει ομογενές το μείγμα που περιέχει. Έπειτα, φυγοκεντρείται σε 2600xg για 20 min. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και ο σωλήνας ζυγίζεται. Η ικανότητα απορρόφησης νερού εκφράζεται ως το βάρος του δεσμευμένου νερού ανά 100 g δείγματος και υπολογίζεται ως εξής:

$$IAN \text{ (g νερού/ 100 g δείγματος)} = \frac{B1-(B2+\beta)}{\beta} 100 \text{ (εξίσωση 25)}$$

όπου B1 το βάρος του σωλήνα με το ενυδατωμένο δείγμα (g), B2 το βάρος του άδειου σωλήνα (g) και β το βάρος του δείγματος (g).

Ικανότητα απορρόφησης ελαίου (IAE)

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με τη μόνη διαφορά ότι αντί για προσθήκη 5 mL απιονισμένου νερού γίνεται προσθήκη 5 mL αραβοσιτέλαιου. Η ικανότητα απορρόφησης ελαίου εκφράζεται ως ο όγκος του δεσμευμένου ελαίου ανά 100 g δείγματος και υπολογίζεται ως εξής:

$$IAE \text{ (mL ελαίου/ 100 g δείγματος)} = \frac{V-Vu}{\beta} 100 \text{ (εξίσωση 26)}$$

όπου V ο αρχικός όγκος του ελαίου (mL), Vu ο όγκος του υπερκείμενου ελαίου (mL) και β το βάρος του δείγματος (g).

4.6 Σχεδιασμός πειραμάτων-Στατιστική επεξεργασία

Στην πειραματική διαδικασία, οι δύο κύριες μέθοδοι εκχύλισης που μελετώνται είναι η συμβατική εκχύλιση πρωτεϊνών και η εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε κάθε περίπτωση μέσω της διαδικασίας της ισοηλεκτρικής καταβύθισής τους, σε pH ίσο με 4,25. Σε κάθε πείραμα που πραγματοποιείται, εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίο οι παράμετροι της εκχύλισης επηρεάζουν τις αποκρίσεις, δηλαδή την απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών, την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών, την ολική απόδοση της διεργασίας και την καθαρότητα των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Οι παράμετροι της εκχύλισης που μελετώνται είναι: 1) ο χρόνος t της εκχύλισης (min), 2) το pH της εκχύλισης, 3) η θερμοκρασία T της εκχύλισης (°C), 4) ο λόγος

στερεού/υγρό w/v που χρησιμοποιείται (g/mL), 5) το είδος του διαλύτη (απιονισμένο νερό ή ευτηκτικός διαλύτης) και 6) η ισχύς P των μικροκυμάτων (W).

Πιο συγκεκριμένα για το στάδιο της εκχύλισης πρωτεϊνών από άλευρο ελαιοκράμβης:

1. Πραγματοποιούνται 8 πειράματα **συμβατικής υδατικής** εκχύλισης των πρωτεϊνών, κατά τα οποία οι παράμετροι έχουν ως εξής:
Σταθερή παράμετρος: χρόνος $t=30$ min,
Μεταβλητές παράμετροι: θερμοκρασία $T=40$ και 50 °C, $pH=8,0$ και $9,0$, λόγος $w/v=1/20$ και $1/25$ g/mL.
Επίσης, πραγματοποιείται 1 πείραμα κατά το οποίο δοκιμάζεται ο λόγος $w/v=1/15$ g/mL κατά το οποίο οι υπόλοιπες παράμετροι έχουν ως εξής: χρόνος $t=30$ min, $pH=8,0$, $T=40$ °C.
Πραγματοποιούνται και 2 πειράματα χρησιμοποιώντας εργαστηριακά **απελαιωμένο άλευρο ελαιοκράμβης** ως πρώτη ύλη κατά τα οποία:
Σταθερές παράμετροι: χρόνος $t=30$ min, θερμοκρασία $T=50$ °C, λόγος $w/v=1/25$ g/m.
Μεταβλητή παράμετρος: $pH=8,0$ και $9,0$.
Τέλος, πραγματοποιείται 1 πείραμα συμβατικής εκχύλισης χρησιμοποιώντας **ευτηκτικό διαλύτη** <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> κατά το οποίο οι παράμετροι έχουν ως εξής: χρόνος $t=30$ min, pH όξινο, $T=50$ °C, λόγος $w/v=1/25$ g/m.
2. Πραγματοποιούνται 16 πειράματα υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από **μικροκύματα**, κατά τα οποία οι παράμετροι έχουν ως εξής:
Σταθερή παράμετρος: $pH=8,0$.
Μεταβλητές παράμετροι: λόγος $w/v=1/20$ και $1/25$ g/mL, χρόνος $t=2, 5, 8$ και 10 min, ισχύς μικροκυμάτων $P=240$ και 400 W.
3. Πραγματοποιούνται 2 πειράματα εκχύλισης χρησιμοποιώντας **θερμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης** ως πρώτη ύλη κατά τα οποία:
Το 1^ο πείραμα αφορά συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών, κατά το οποίο οι παράμετροι έχουν ως εξής:
Χρόνος $t=30$ min, θερμοκρασία $T=50$ °C, $pH=9,0$, λόγος $w/v=1/25$ g/mL.
Το 2^ο πείραμα αφορά υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα, κατά το οποίο οι παράμετροι έχουν ως εξής:
 $pH=8,0$, λόγος $w/v=1/25$ g/mL, χρόνος $t=10$ min, ισχύς μικροκυμάτων $P=400$ W.
4. Πραγματοποιούνται 8 πειράματα εκχύλισης χρησιμοποιώντας **ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης** ως πρώτη ύλη κατά τα οποία:
Τα 4 πείραμα αφορούν συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών, κατά τα οποία οι παράμετροι έχουν ως εξής:
Σταθερές παράμετροι: χρόνος $t=30$ min, θερμοκρασία $T=50$ °C, $pH=9,0$, λόγος $w/v=1/25$ g/mL.
Μεταβλητή παράμετρος: είδος του χρησιμοποιούμενου ενζύμου (Cellic Htec, Cellic Ctec2, μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2, λευκό δείγμα)

Τα υπόλοιπα 4 πείραμα αφορούν υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα, κατά τα οποία οι παράμετροι έχουν ως εξής: Σταθερές παράμετροι: pH=8,0, λόγος w/v= 1/25 g/mL, χρόνος t=10 min, ισχύς μικροκυμάτων P=400 W.

Μεταβλητή παράμετρος: είδος του χρησιμοποιούμενου ενζύμου (Cellic Htec, Cellic Ctec2, μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2, λευκό δείγμα).

Η ικανότητα απορρόφησης νερού και η ικανότητα απορρόφησης ελαίου έχουν μελετηθεί στα εξής 8 πειράματα:

1. Συμβατική υδατική εκχύλιση με χρόνο t=30 min, θερμοκρασία T= 50 °C, pH= 9,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL.
2. Συμβατική υδατική εκχύλιση με θερμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης με χρόνο t=30 min, θερμοκρασία T= 50 °C, pH= 9,0, λόγο w/v=1/25 g/mL.
3. Συμβατική υδατική εκχύλιση με ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης από Cellic Ctec2 με χρόνο t=30 min, θερμοκρασία T= 50 °C, pH= 9,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL.
4. Συμβατική υδατική εκχύλιση με ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης από μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2 με χρόνο t=30 min, θερμοκρασία T= 50 °C, pH= 9,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL.
5. Υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με pH=8,0, λόγο w/v=1/25 g/mL, χρόνο t=10 min, ισχύ μικροκυμάτων P=400 W.
6. Υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με θερμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης με pH=8,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL, χρόνο t=10 min, ισχύ μικροκυμάτων P=400 W.
7. Υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης από Cellic Ctec2 με pH=8,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL, χρόνο t=10 min, ισχύ μικροκυμάτων P=400 W.
8. Υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με ενζυμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης από μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2 με pH=8,0, λόγο w/v= 1/25 g/mL, χρόνο t=10 min, ισχύ μικροκυμάτων P=400 W.

Στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το πρόγραμμα STATISTICA 7 και πιο συγκεκριμένα τα εργαλεία της ανάλυσης διακύμανσης κυρίων παραγόντων (main effects ANOVA) για την εύρεση των στατιστικά σημαντικών παραγόντων σε κάθε απόκριση και του ελέγχου Duncan (Duncan's test) για την εύρεση ύπαρξης ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στις τιμές των προς εξέταση παραγόντων.

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα- Συζήτηση αποτελεσμάτων

5.1 Σύσταση πρώτης ύλης

Το πρωτεϊνικό άλευρο που παραλήφθηκε και χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη έχει περιεκτικότητα σε έλαιο ίση με 3,25% (ξ.β.), περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ίση με 39,47% (ξ.β.) και περιεκτικότητα σε υγρασία ίση με 9,98%. Οι τιμές αυτές συνάδουν με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές που αναφέρθηκαν στον πίνακα 3.2 του κεφαλαίου 3.

5.2 Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου (pI)

Η εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος αφορά τη θολότητα του υπερκείμενου υγρού που προκύπτει ύστερα από την πρώτη φυγοκέντρηση της πειραματικής διαδικασίας. Όσο μικρότερη είναι η θολότητα του υγρού, τόσο μεγαλύτερο είναι το ίζημα των καταβυθισμένων πρωτεϊνών. Άρα, η τιμή pH με τη μικρότερη θολότητα του υγρού αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Για τις οκτώ τιμές pH που μελετήθηκαν προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Πίνακας 5.1. Αποτελέσματα του προσδιορισμού της θολότητας

Τιμές pH	Όγκος δείγματος (mL)	Θολότητα (NTU)
3,00	47	80,0
3,50	47	42,8
4,00	45	119
4,25	46	134
4,50	45	210
4,75	46	138
5,00	45	96,2
5,50	45	124

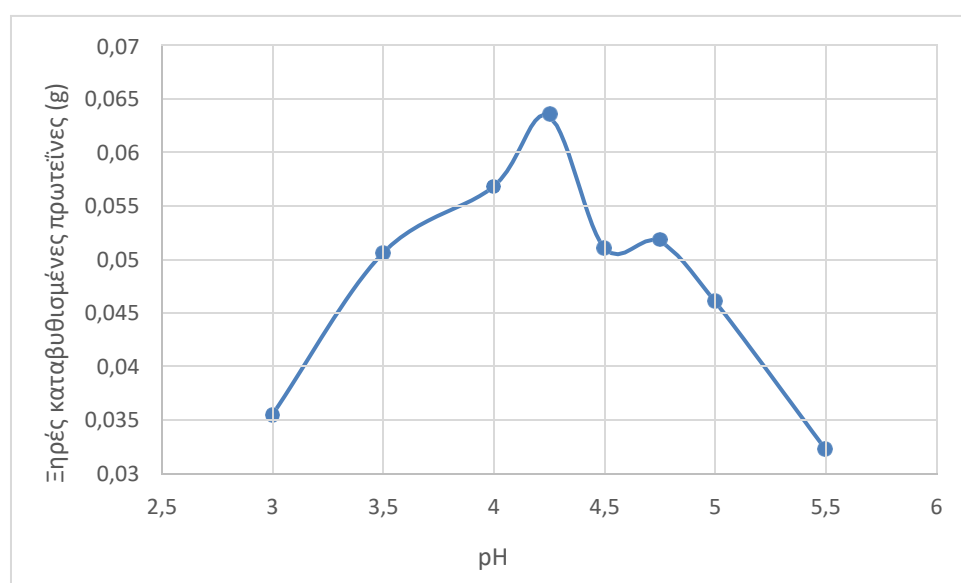
Να σημειωθεί ότι όγκος του συνολικού υπερκείμενου υγρού είναι 430 mL και θολότητά του ανέρχεται στα 655 NTU. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία έμμεση μέθοδο προσδιορισμού του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό, μελετάται και μία άμεση μέθοδος προσδιορισμού του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών που αφορά τη μέτρηση της μάζας των καταβυθισμένων πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα pH που μελετώνται. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου αποτυπώνονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2. Αποτελέσματα της μέτρησης της μάζας των καταβυθισμένων πρωτεϊνών

Τιμές pH	Μάζα ενυδατωμένων καταβυθισμένων πρωτεϊνών (g)	Μάζα ξηρών καταβυθισμένων πρωτεϊνών (g)
3,00	0,55	0,0355
3,50	0,69	0,0506
4,00	0,72	0,0568
4,25	0,81	0,0634
4,50	0,71	0,0511
4,75	0,63	0,0517
5,00	0,51	0,0461
5,50	0,41	0,0323

Η τιμή pH στην οποία παρατηρείται μέγιστη καταβύθιση των πρωτεϊνών ισούται με το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Η τιμή αυτή για τις πρωτεΐνες της ελαιοκράμβης βρίσκεται στην περιοχή γύρω από το 4,25, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.2.

Η μάζα των ξηρών καταβυθισμένων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH φαίνεται και στο διάγραμμα 5.1.



Διάγραμμα 5.1. Μάζα ξηρών καταβυθισμένων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH καταβύθισης

5.3 Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης

Στους πίνακες και στα διαγράμματα που παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια αποτυπώνονται τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης, όπως παρουσιάστηκαν στον σχεδιασμό πειραμάτων στο κεφάλαιο 4.6. Πραγματοποιείται αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για την κάθε μέθοδο

εκχύλισης ξεχωριστά, αλλά και σε σύγκριση μεταξύ τους. Η αξιολόγηση αυτή αφορά τις αποδόσεις της διεργασίας (Απόδοση Εκχύλισης Α.Ε., Απόδοση Καταβύθισης Α.Κ., Ολική Απόδοση Ο.Α.) και την ποιότητα των τελικών πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων (protein isolates-p.i.), δηλαδή την καθαρότητά τους σε πρωτεΐνες (Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο υπερσυμπυκνώματος επί %- Π.Π.) και την ικανότητα απορρόφησης νερού (I.A.N.) και ικανότητα απορρόφησης ελαίου (I.A.E.) που έχουν. Στόχος είναι η επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων και η παραλαβή πρωτεϊνικού υπερσυμπυκνώματος με υψηλή καθαρότητα σε πρωτεΐνες και καλές λειτουργικές ιδιότητες. Υψηλή απόδοση εκχύλισης και απόδοση καταβύθισης σημαίνει και υψηλή ολική απόδοση, η οποία σε συνδυασμό με υψηλά καθαρό σε πρωτεΐνες πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα αποτελεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

5.3.1 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική υδατική μέθοδο εκχύλισης

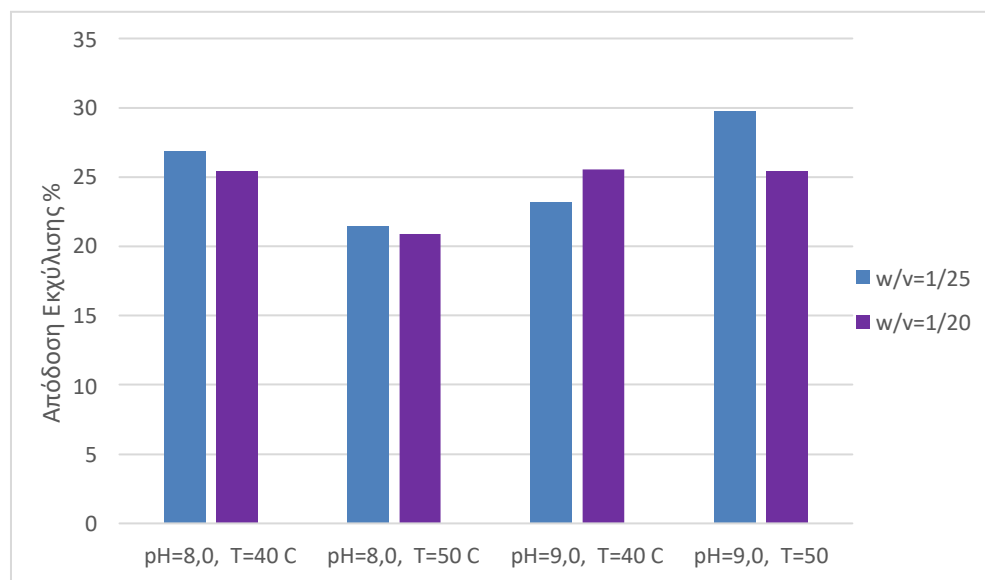
Κατά την πειραματική διαδικασία, η μέθοδος εκχύλισης των πρωτεϊνών που μελετήθηκε αρχικά είναι η συμβατική μέθοδος εκχύλισης. Στον πίνακα 5.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συμβατικής υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 5.3. Αποτελέσματα συμβατικής υδατικής εκχύλισης διάρκειας 30 min

Συνθήκες			Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
pH	Θερμοκρασία (°C)	Λόγος στερεού/υγρό (g/ mL)				
8,0	40	1/25	26,84	13,80	3,70	67,60
8,0	40	1/20	25,40	15,31	3,89	69,44
8,0	40	1/15	24,09	15,00	3,61	69,24
8,0	50	1/25	21,49	21,35	4,59	82,63
8,0	50	1/20	20,87	22,66	4,73	80,80
9,0	40	1/25	23,17	26,23	6,08	82,46
9,0	40	1/20	25,52	22,18	5,66	86,1
9,0	50	1/25	29,76	31,41	9,35	83,50
9,0	50	1/20	25,45	27,65	7,04	82,01

Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης και ολική απόδοση επιτυγχάνονται στη συμβατική υδατική εκχύλιση για pH εκχύλισης ίσο με 9,0, θερμοκρασία ίση με 50 °C και λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/25 g/mL. Σε αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται και υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Το υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο προκύπτει για pH

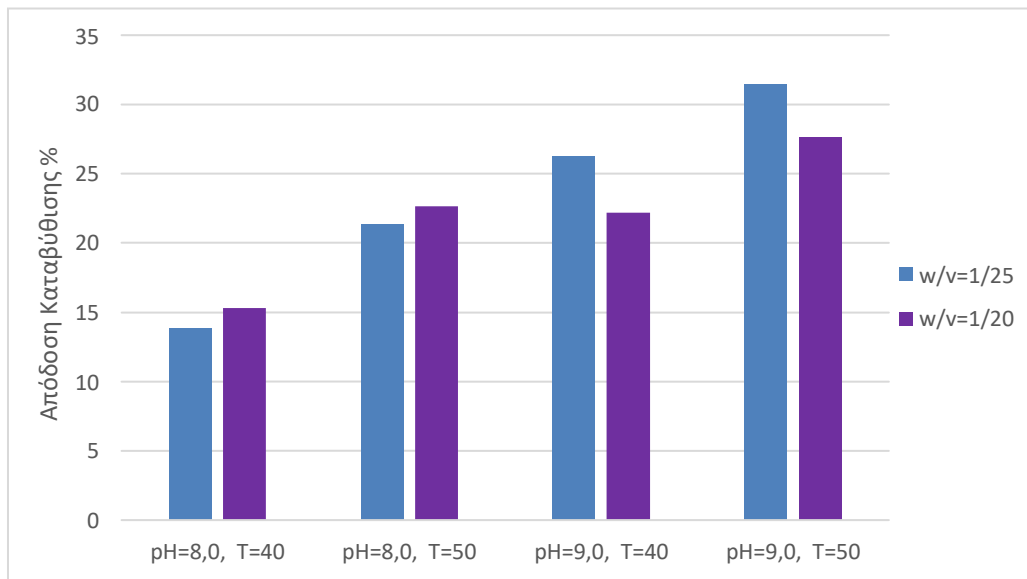
εκχύλισης ίσο με 9,0, θερμοκρασία ίση με 40 °C και λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/20 g/mL. Επίσης, ο λόγος w/v=1/15 g/mL έχει μελετηθεί μόνο για τη συμβατική υδατική εκχύλιση για pH ίσο με 8,0 και θερμοκρασία ίση με 40 °C. Αυτό διότι επιτυγχάνει τη χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης ανάμεσα στους λόγους 1/20 και 1/25 στις ίδιες συνθήκες και τη χαμηλότερη ολική απόδοση, αντιστοίχως. Για αυτόν τον λόγο, δεν ερευνάται ο συγκεκριμένος λόγος w/v=1/15 g/mL στα υπόλοιπα πειράματα. Για πιο αναλυτική περιγραφή των αποτελεσμάτων παρατίθενται και διαγράμματα, για τις τέσσερις αποκρίσεις ξεχωριστά.



Διάγραμμα 5.2. Μεταβολή της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, το pH εκχύλισης και τη θερμοκρασία

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι για pH ίσο με 8, με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η απόδοση εκχύλισης και με την αύξηση του λόγου στερεού/υγρό μειώνεται σε μικρό βαθμό η απόδοση εκχύλισης. Για pH ίσο με 9,0, με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η απόδοση εκχύλισης για λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/25. Για pH 9,0 και θερμοκρασία 40 °C, ο λόγος στερεού/υγρό 1/20 δίνει μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης, ενώ για pH 9,0 και θερμοκρασία 50 °C, ο λόγος στερεού/υγρό 1/25 δίνει μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης. Στη θερμοκρασία των 40 °C, οι τιμές pH 8,0 και 9,0 φαίνεται να δίνουν παραπλήσια αποτελέσματα, ενώ στη θερμοκρασία των 50 °C, η τιμή pH 9,0 δίνει πολύ μεγαλύτερες τιμές απόδοσης εκχύλισης.

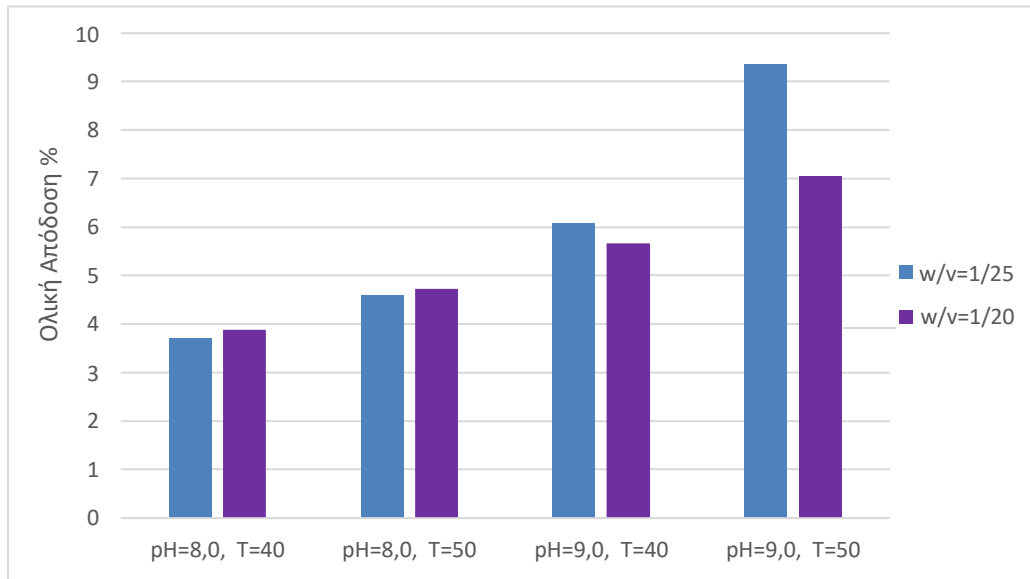
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.1 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμοκρασία, ο λόγος στερεού/υγρό και το pH δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες σε επίπεδο σημαντικότητας 95% για την απόδοση εκχύλισης της συμβατικής υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 5.3. Μεταβολή της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, το pH εκχύλισης και τη θερμοκρασία

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι για pH 8,0 με την αύξηση της θερμοκρασίας και του λόγου στερεού/υγρό, αυξάνεται η απόδοση καταβύθισης, ενώ για pH 9,0 με την αύξηση της θερμοκρασίας και τη μείωση του λόγου, αυξάνεται η απόδοση καταβύθισης. Και στις δύο θερμοκρασίες των 40 και 50 °C, παρατηρούνται μεγαλύτερες αποδόσεις καταβύθισης σε pH 9,0 παρά σε pH 8,0 και για τους δύο λόγους στερεού/υγρό.

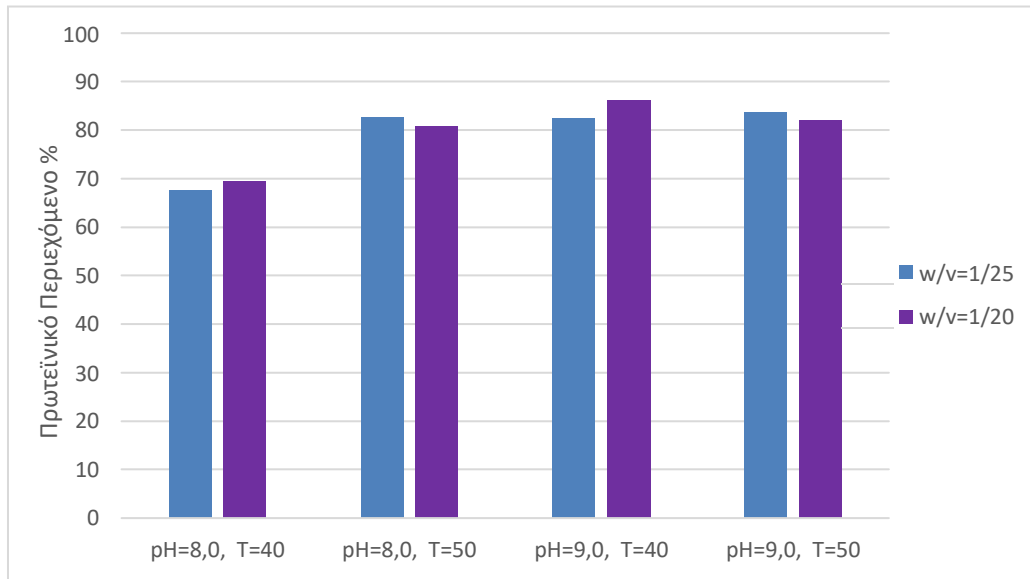
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.2 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμοκρασία και το pH αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, από τον έλεγχο Duncan για τον παράγοντα της θερμοκρασίας (πίνακας Π.3 παραρτήματος), προκύπτει ότι η θερμοκρασία των 50 °C διαφέρει σημαντικά από τη θερμοκρασία των 40 °C, δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση. Από τον έλεγχο Duncan για τον παράγοντα του pH (πίνακας Π.4 παραρτήματος), προκύπτει ότι η τιμή pH 9,0 διαφέρει σημαντικά από την τιμή pH 8,0, δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση. Από την άλλη ο λόγος στερεού/υγρό δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση καταβύθισης. Οπότε, οι βέλτιστες συνθήκες για την απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι pH ίσο με 9,0 και θερμοκρασία ίση με 50 °C.



Διάγραμμα 5.4. Μεταβολή της ολικής απόδοσης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, το pH εκχύλισης και τη θερμοκρασία

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι για pH 8,0, η ολική απόδοση αυξάνεται για αύξηση του λόγου στερεού/υγρό και για αύξηση της θερμοκρασίας. Για pH 9,0, η ολική απόδοση αυξάνεται για αύξηση της θερμοκρασίας και για μείωση του λόγου στερεού/υγρό. Το pH 9,0 φαίνεται ότι δίνει καλύτερα αποτελέσματα ολικής απόδοσης από ότι το pH 8,0, για κάθε θερμοκρασία και λόγο στερεού/υγρό.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.5 παραρτήματος) προκύπτει ότι το pH αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, από τον έλεγχο Duncan για τον παράγοντα του pH (πίνακας Π.6 παραρτήματος), προκύπτει ότι η τιμή pH 9,0 διαφέρει σημαντικά από την τιμή pH 8,0, δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα στην ολική απόδοση όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση. Από την άλλη ο λόγος στερεού/υγρό και η θερμοκρασία δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την ολική απόδοση. Οπότε, η βέλτιστη συνθήκη για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι pH ίσο με 9,0.



Διάγραμμα 5.5. Μεταβολή του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, το pH εκχύλισης και τη θερμοκρασία

Για pH ίσο με 8,0, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων αυξάνεται όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, ενώ ο λόγος στερεού/υγρό δεν φαίνεται να επηρεάζει με συγκεκριμένο τρόπο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Για pH 9,0, ούτε ο λόγος στερεού/υγρό, ούτε η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζουν με συγκεκριμένο τρόπο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Η τιμή pH 9,0 δίνει καλύτερα αποτελέσματα στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων σε σχέση με την τιμή pH 8,0 και για τις δύο θερμοκρασίες και για τους δύο λόγους στερεού/υγρό.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.7 παραρτήματος) προκύπτει ότι το pH, ο λόγος στερεού/υγρό και η θερμοκρασία δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών.

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτει ότι στη συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών από άλευρο ελαιοκράμβης η βέλτιστη τιμή pH είναι ίση με 9,0 και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι η θερμοκρασία των 50 °C. Για τις συγκεκριμένες αυτές συνθήκες και ανάμεσα στους λόγους στερεού/υγρό 1/20 g/mL και 1/25 g/mL, επιλέγεται ο λόγος 1/25 g/mL ως βέλτιστος διότι δίνει υψηλότερες αποδόσεις και υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα.

Σε αυτές τις συνθήκες, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου παίρνουν τις τιμές που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι τιμές αυτές είναι ικανοποιητικές.

Πίνακας 5.4. Αποτελέσματα ικανότητας απορρόφησης νερού και ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση διάρκειας 30 min, pH 9,0, θερμοκρασίας 50 °C και λόγου στερεού/υγρό 1/25 g/mL

Ικανότητα Απορρόφησης Νερού (g νερού/100 g δείγματος)	Ικανότητα Απορρόφησης Ελαίου (mL ελαίου/100 g δείγματος)
433	640

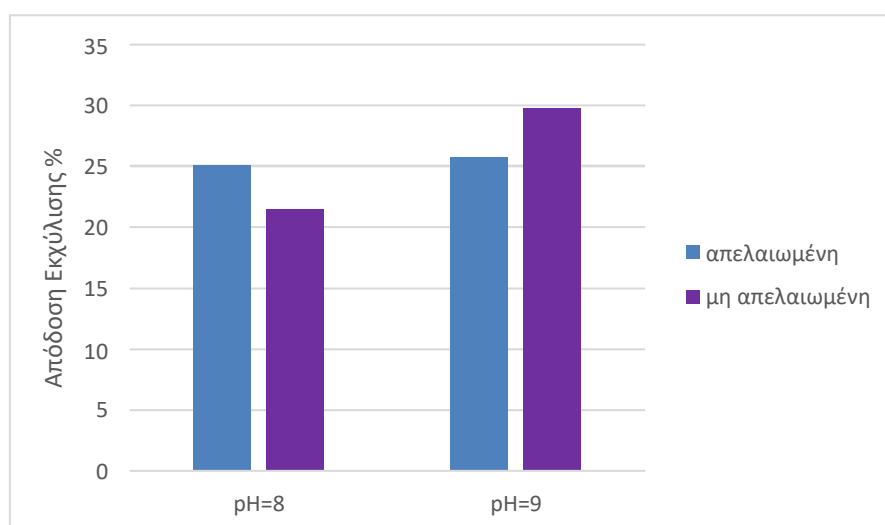
5.3.2 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική υδατική μέθοδο εκχύλισης χρησιμοποιώντας απειαιωμένο πρωτεϊνικό άλευρο

Κατά την πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε σε ορισμένα δείγματα να πραγματοποιηθεί εργαστηριακή απειαίωση του πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται τυχόν σχηματισμός γαλακτώματος που μπορεί να συμβεί λόγω ύπαρξης ελαίου που ενδεχομένως να έχει επιπτώσεις στην εκχύλιση των πρωτεϊνών. Στον πίνακα 5.5. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συμβατικής υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εργαστηριακά απειαιωμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης.

Πίνακας 5.5. Αποτελέσματα συμβατικής υδατικής εκχύλισης από απειαιωμένο πρωτεϊνικό άλευρο διάρκειας 30 min, θερμοκρασίας 50 °C και λόγου στερεού/υγρό 1/25 g/mL

Συνθήκες	Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
pH 8,0	25,09	18,19	4,56	75,79
pH 9,0	25,77	27,19	7,01	89,65

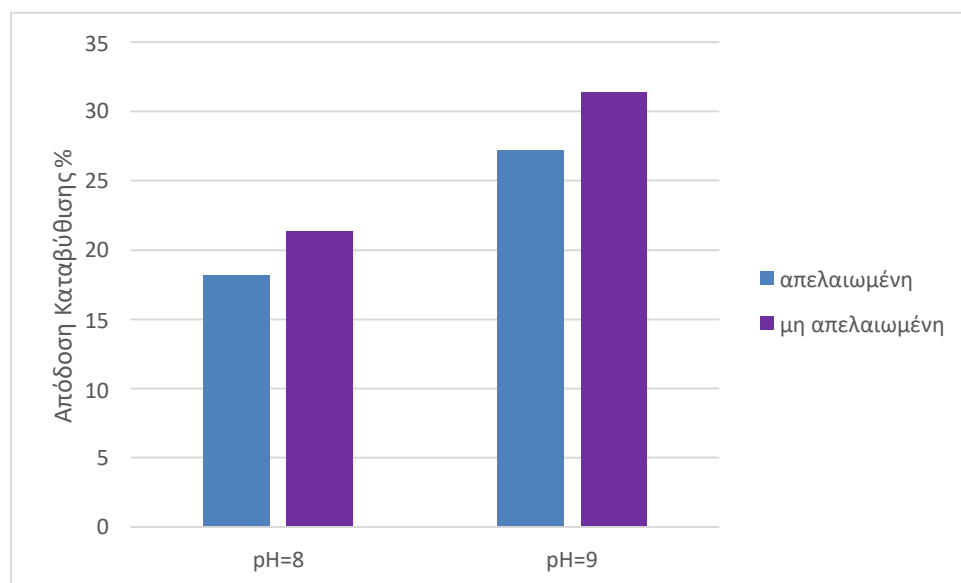
Τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης με απειαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη συγκρίνονται μέσω διαγραμμάτων με τα αντίστοιχα πειράματα συμβατικής εκχύλισης με μη απειαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη.



Διάγραμμα 5.6. Σύγκριση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών από μη απειαιωμένη και απειαιωμένη πρώτη ύλη

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι για pH 8,0 υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών δίνει η απελαιωμένη πρώτη ύλη, ενώ για pH 9,0 υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών δίνει η μη απελαιωμένη πρώτη ύλη.

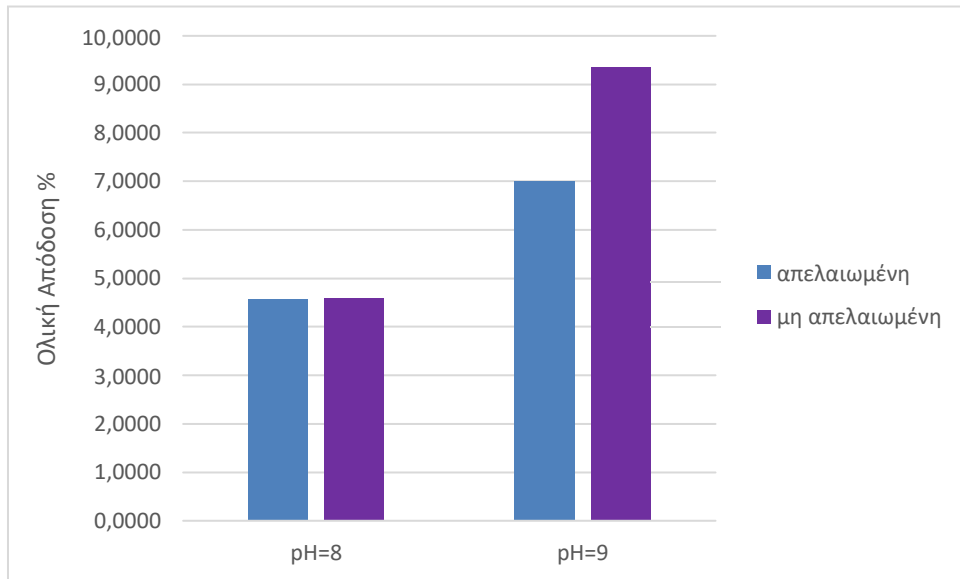
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.8 παραρτήματος) προκύπτει ότι η χρήση ή μη απελαιωμένης πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση εκχύλισης της συμβατικής υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 5.7. Σύγκριση της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών από μη απελαιωμένη και απελαιωμένη πρώτη ύλη

Όσον αφορά την απόδοση καταβύθισης, φαίνεται ότι η μη απελαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη δίνει καλύτερα αποτελέσματα και στις δύο τιμές pH.

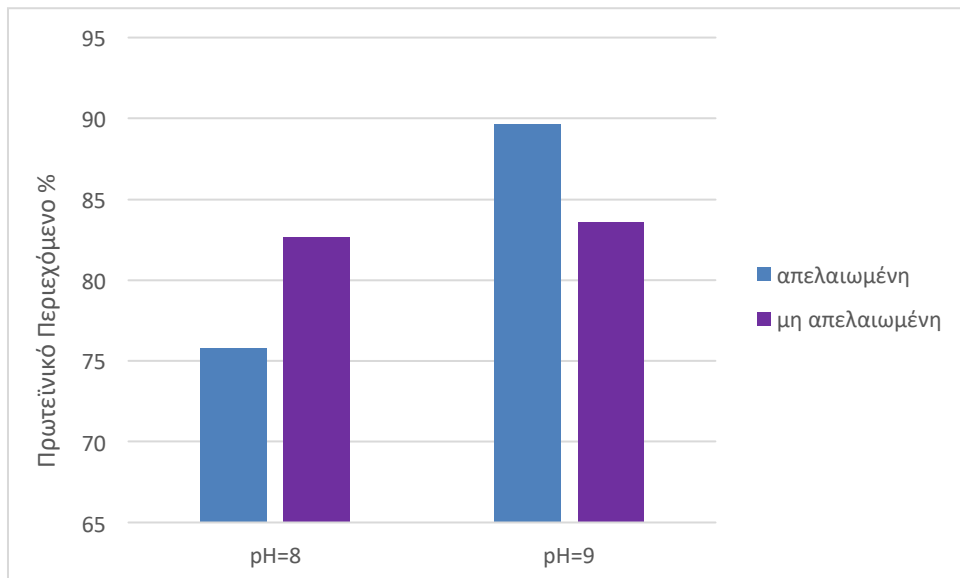
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.9 παραρτήματος) προκύπτει ότι η χρήση ή μη απελαιωμένης πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 5.8. Σύγκριση της ολικής απόδοσης από μη απελαιωμένη και απελαιωμένη πρώτη ύλη

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι για pH 9,0, η μη απελαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη δίνει υψηλότερη ολική απόδοση.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.10 παραρτήματος) προκύπτει ότι η χρήση ή μη απελαιωμένης πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 5.9. Σύγκριση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων από μη απελαιωμένη και απελαιωμένη πρώτη ύλη

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι για pH 8,0, η μη απελαιωμένη πρώτη ύλη δίνει υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, ενώ για

pH 9,0, η απειλαιωμένη πρώτη ύλη δίνει υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.11 παραρτήματος) προκύπτει ότι η χρήση ή μη απειλαιωμένης πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις αποκρίσεις ανάμεσα στις δύο πρώτες ύλες. Για αυτόν τον λόγο επιλέγεται να μην προστεθεί το στάδιο της εργαστηριακής απειλαίωσης του αλεύρου στην πειραματική διαδικασία. Επιπλέον, η απειλαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη δεν δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη μη απειλαιωμένη εργαστηριακά.

5.3.3 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης χρησιμοποιώντας ευτηκτικό διαλύτη

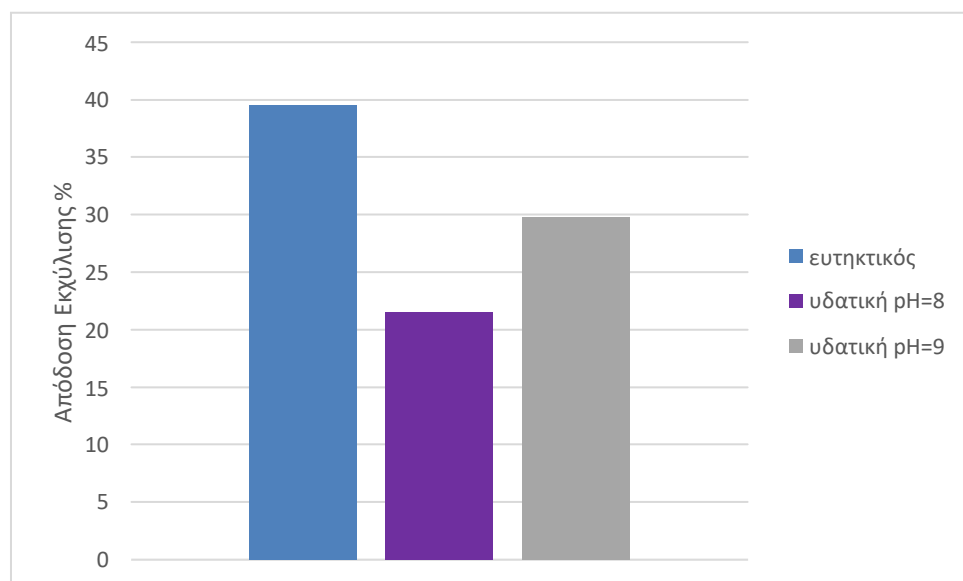
Κατά τη συμβατική εκχύλιση δοκιμάστηκε ως διαλύτης ευτηκτικός διαλύτης <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> εναλλακτικά του νερού. Η χρήση ευτηκτικού διαλύτη αποτελεί μία πιο πράσινη προσέγγιση εκχύλισης, αφού αυτός αποτελείται από συστατικά που βρίσκονται στα τρόφιμα. Γενικά, οι ευτηκτικοί διαλύτες έχουν ερευνηθεί για την εκχύλιση διάφορων συστατικών, αλλά για τις πρωτεΐνες δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες. Αξίζει όμως η μελέτη των ευτηκτικών διαλυτών για την εκχύλιση πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη. Τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών με ευτηκτικό διαλύτη <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.6. Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης με ευτηκτικό διαλύτη, διάρκειας 30 min, θερμοκρασίας 50 °C, λόγου στερεού/υγρό 1/25 g/mL και όξινου pH και συμβατικής υδατικής εκχύλισης, διάρκειας 30 min, θερμοκρασίας 50 °C, λόγου στερεού/υγρό 1/25 g/mL και pH 8,0 και 9,0

Συνθήκες	Απόδοση Εκχύλισης
Διαλύτης: Ευτηκτικός διαλύτης	39,55
Διαλύτης: νερό, pH εκχύλισης 8,0	21,49
Διαλύτης: νερό, pH εκχύλισης 9,0	29,76

Κατά την πειραματική διαδικασία, όταν χρησιμοποιούταν ευτηκτικός διαλύτης <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> κατά την εκχύλιση, δεν ήταν δυνατή η καταβύθιση των πρωτεϊνών στο

ισοηλεκτρικό τους σημείο και η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Για αυτόν τον λόγο, στον πίνακα 5.6 καταγράφεται μόνο η απόδοση εκχύλισης.



Διάγραμμα 5.10. Σύγκριση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών της συμβατικής υδατικής εκχύλισης και της συμβατικής εκχύλισης με ευτηκτικό διαλύτη (διάρκεια 30 min, θερμοκρασία 50 °C, λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL)

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών όταν χρησιμοποιείται ευτηκτικός διαλύτης (39,55%) είναι υψηλότερη από τις αντίστοιχες αποδόσεις εκχύλισης της συμβατικής υδατικής εκχύλισης για pH 9,0 και 8,0 (29,76% και 21,49%, αντίστοιχα).

Παρά την υψηλή απόδοση εκχύλισης κατά τη χρήση ευτηκτικού διαλύτη, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει απόκλιση στον υπολογισμό της. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το σύστημα ευτηκτικός διαλύτης-νερό είχε αρκετά υψηλό ιξώδες. Έτσι, υπήρξε δυσκολία, μεταξύ άλλων, στη ξήρανση του στερεού υπολείμματος, η μάζα του οποίου σε ξ.β. συμμετέχει στον υπολογισμό της απόδοσης εκχύλισης.

Λόγω της αποτυχίας καταβύθισης των πρωτεϊνών και της απόκλισης που μπορεί να υπάρχει στον υπολογισμό της απόδοσης εκχύλισης, η συμβατική εκχύλιση με ευτηκτικό διαλύτη δεν εξετάζεται περαιτέρω στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

5.3.4 Αποτελέσματα παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων με τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα

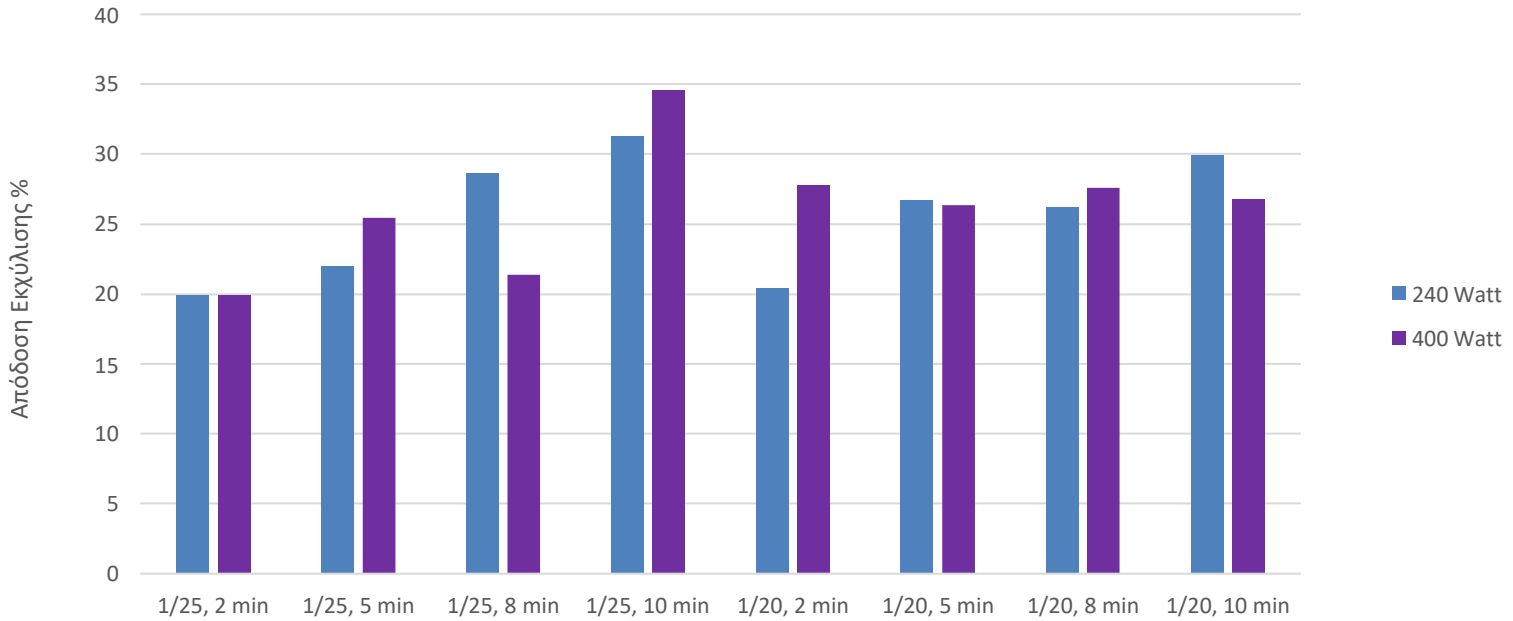
Η νέα μέθοδος εκχύλισης που μελετήθηκε είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Η εκχύλιση με μικροκύματα βασίζεται στη μετατροπή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε θερμική ενέργεια σε όλον τον όγκο της πρώτης ύλης. Δηλαδή, η θερμότητα διαχέεται με ομοιόμορφο τρόπο στην πρώτη ύλη και έτσι επιτυγχάνεται υψηλότερο ποσοστό αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων του στερεού προς εκχύλιση υποστρώματος. Έτσι, επιτυγχάνεται μεγαλύτερο

ποσοστό απελευθέρωσης των πρωτεϊνών προς το εξωτερικό των κυττάρων, δηλαδή μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών. Στον πίνακα 5.7. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από μικροκύματα.

Πίνακας 5.7. Αποτελέσματα υδατικής εκχύλισης πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από μικροκύματα (pH 8,0)

Συνθήκες			Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
Λόγος στερεού/υγρό (g/ mL)	Χρόνος (min)	Ισχύς μικροκυμάτων (W)				
1/20	2	240	20,41	15,59	4,33	81,70
1/20	2	400	27,79	7,32	1,33	51,25
1/20	5	240	26,70	7,32	1,93	60,84
1/20	5	400	26,35	11,58	3,05	71,27
1/20	8	240	26,24	15,76	4,14	73,54
1/20	8	400	27,58	15,10	4,17	87,68
1/20	10	240	29,94	14,92	4,47	73,76
1/20	10	400	26,76	17,20	4,60	84,41
1/25	2	240	19,96	16,21	3,24	68,26
1/25	2	400	19,92	28,61	5,70	68,15
1/25	5	240	21,98	30,96	6,80	65,87
1/25	5	400	25,42	21,41	5,44	70,46
1/25	8	240	28,66	14,37	4,12	63,25
1/25	8	400	21,38	12,46	2,66	82,53
1/25	10	240	31,29	13,46	4,21	68,88
1/25	10	400	34,57	21,26	7,35	71,44

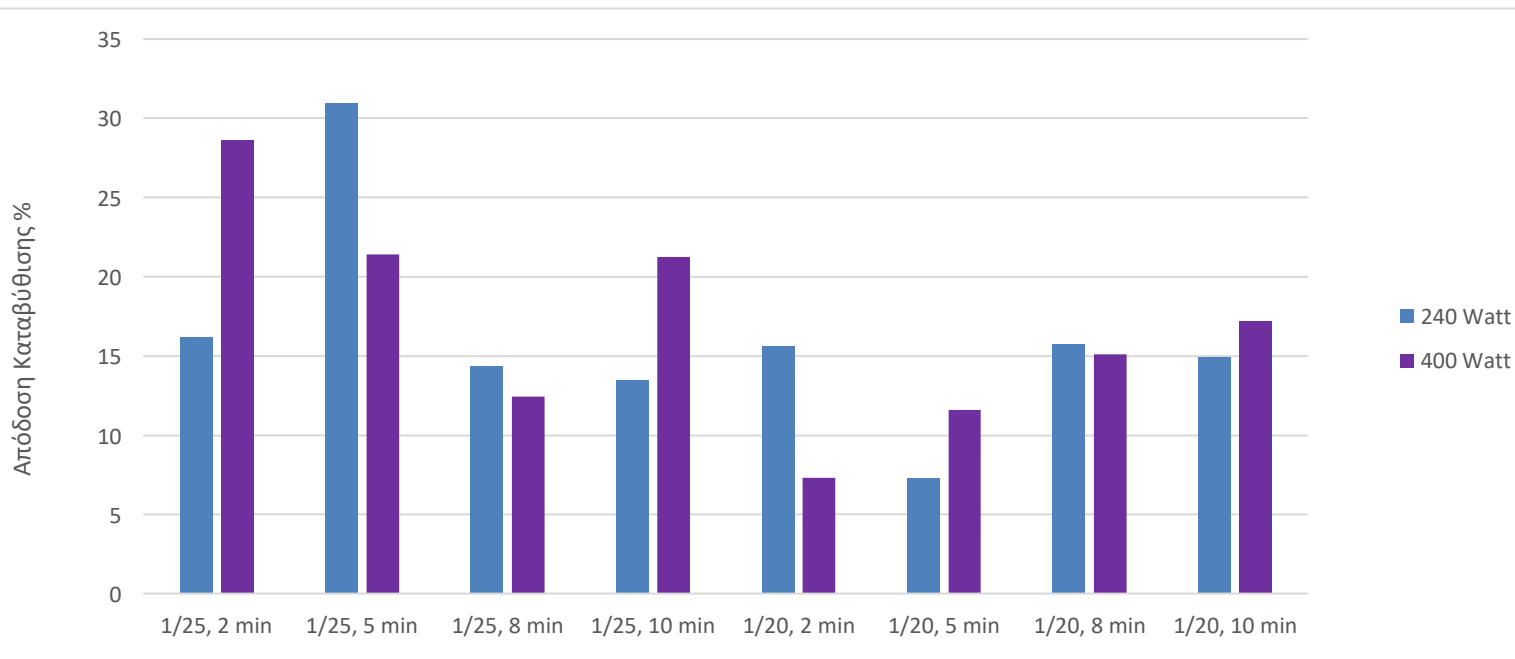
Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση εκχύλισης και ολική απόδοση επιτυγχάνονται για λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/25 g/mL, χρόνο 10 min και ισχύ 400 W. Σε αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται και ικανοποιητική απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών και ικανοποιητικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων. Η βέλτιστη απόδοση καταβύθισης σημειώνεται για λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/25 g/mL, χρόνο 5 min και ισχύ 240 W, για τα οποία η απόδοση εκχύλισης και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κυμαίνονται σε χαμηλές τιμές. Τέλος, το μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο σημειώνεται για λόγο στερεού/υγρό ίσο με 1/20 g/mL, χρόνο 10 min και ισχύ 400 W, για τα οποία η απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης και ολική απόδοση βρίσκονται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Για πιο αναλυτική περιγραφή των αποτελεσμάτων παρατίθενται και διαγράμματα, για τις τέσσερις αποκρίσεις ξεχωριστά.



Διάγραμμα 5.11. Μεταβολή της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, τον χρόνο και την ισχύ

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι με την αύξηση του χρόνου υπάρχει μία τάση αύξησης της απόδοσης εκχύλισης, για λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL και ισχύ 240 W, λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL και ισχύ 400 W και λόγο στερεού/υγρό 1/20 g/mL και ισχύ 240 W. Από την άλλη, η ισχύς των μικροκυμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζει με συγκεκριμένο τρόπο την απόδοση εκχύλισης. Τέλος, όσον αφορά τον λόγο στερεού/υγρό, φαίνεται ότι για τους χρόνους 2 και 5 min, ο λόγος 1/20 g/mL επιτυγχάνει υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης, ενώ για χρόνους 8 και 10 min, ο λόγος 1/25 g/mL επιτυγχάνει γενικά υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης.

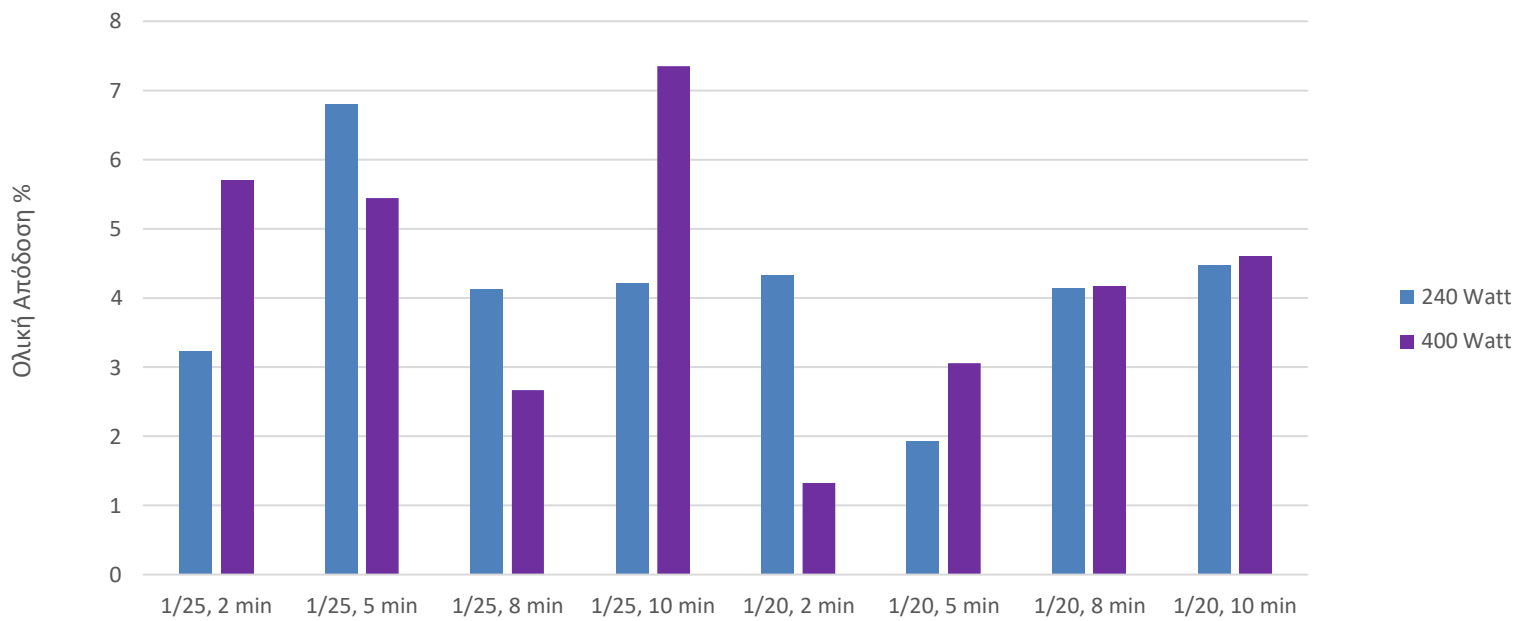
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.12 παραρτήματος) προκύπτει ότι ο χρόνος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση εκχύλισης της υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από μικροκύματα. Από την άλλη, η ισχύς των μικροκυμάτων και ο λόγος στερεού/υγρό δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την απόδοση εκχύλισης της υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από μικροκύματα. Από τον έλεγχο Duncan για τον παράγοντα του χρόνου (πίνακας Π.13 παραρτήματος), προκύπτει ότι ο χρόνος 10 min διαφέρει σημαντικά από τον χρόνο 2 min, δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση εκχύλισης της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.12. Μεταβολή της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, τον χρόνο και την ισχύ

Όσον αφορά την ισχύ, παρατηρείται ότι για χρόνο 8 min επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση καταβύθισης με ισχύ 240 W, ανεξαρτήτως του λόγου στερεού/υγρό. Από την άλλη για χρόνο 10 min επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση καταβύθισης με ισχύ 400 W, ανεξαρτήτως του λόγου στερεού/υγρό. Όσον αφορά τον χρόνο, παρατηρείται ότι για λόγο στερεού/υγρό 1/20 g/mL και για την ισχύ των μικροκυμάτων 400 W, με την αύξηση του χρόνου αυξάνεται η απόδοση καταβύθισης. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις, δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση. Όσον αφορά τον λόγο στερεού/υγρό, για τους χρόνους 2 και 5 min ο λόγος 1/25 g/mL δίνει καλύτερα αποτελέσματα, ενώ για χρόνους 8 και 10 min ο λόγος 1/20 g/mL δίνει γενικά καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών.

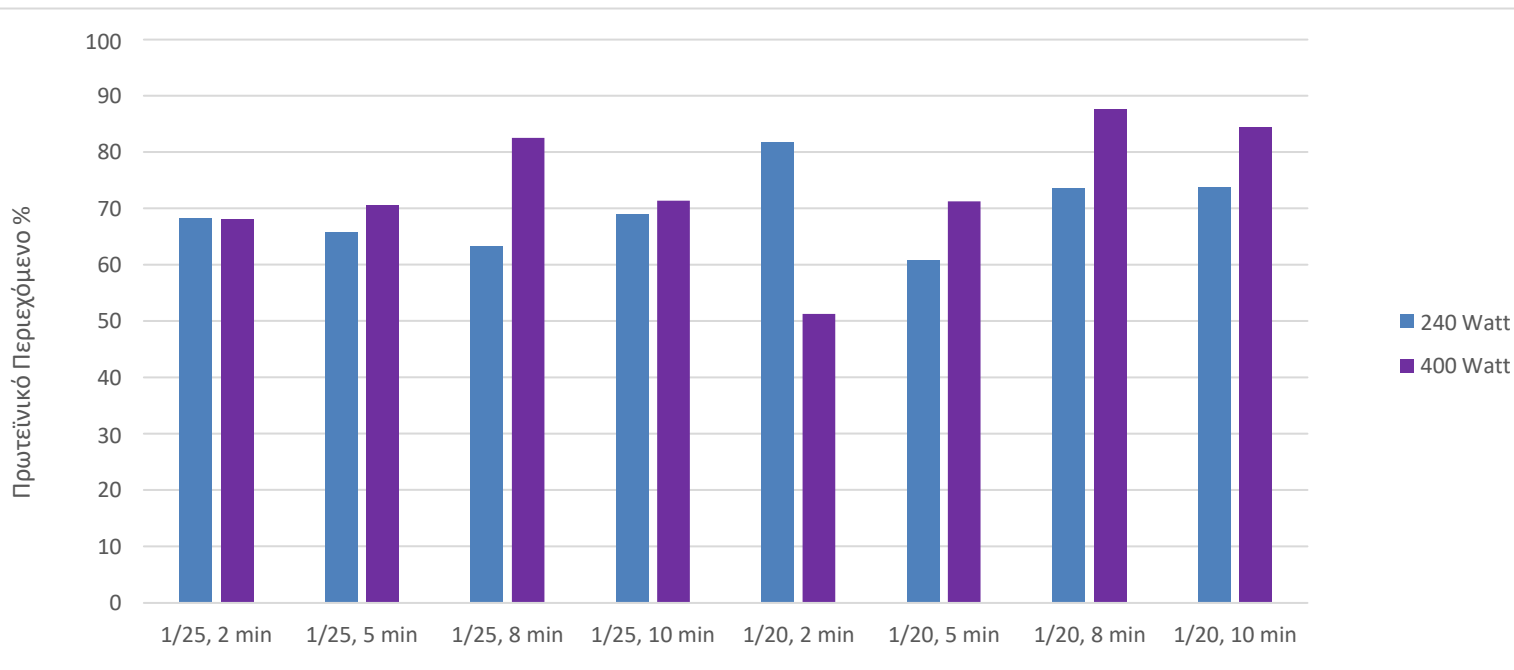
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.14 παραρτήματος) προκύπτει ότι ο χρόνος, η ισχύς και ο λόγος στερεού/υγρό δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την απόδοση καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.13. Μεταβολή της ολικής απόδοσης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, τον χρόνο και την ισχύ

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται για λόγο στερεού/υγρό 1/20 g/mL και ισχύ 240 και 400 W και για λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL και ισχύ 240 W μία γενική τάση αύξησης της ολικής απόδοσης όταν αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης. Επιπλέον, για λόγο στερεού/υγρό 1/20 g/mL και για χρόνους 5, 8 και 10 min παρατηρείται ότι η ισχύς των 400 W επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα της ολικής απόδοσης σε σχέση με την ισχύ των 240 W. Από την άλλη, για λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ ισχύος και ολικής απόδοσης. Όσον αφορά τον λόγο στερεού/υγρό, στην ισχύ των 240 W επιτυγχάνει υψηλότερη ολική απόδοση ο λόγος 1/20 g/mL (πέρα του χρόνου των 5 min) και στην ισχύ των 400 W επιτυγχάνει υψηλότερη ολική απόδοση ο λόγος 1/25 g/mL (πέρα του χρόνου των 8 min).

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.15 παραρτήματος) προκύπτει ότι ο χρόνος εκχύλισης, η ισχύς των μικροκυμάτων και ο λόγος στερεού/υγρό δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.14. Μεταβολή του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ανάλογα με τον λόγο στερεού/υγρό, το pH εκχύλισης και τη θερμοκρασία

Όσον αφορά τον παράγοντα του χρόνου, παρατηρείται ότι για την ισχύ των 400 W το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου μέχρι τα 8 min, από όπου και έπειτα μειώνεται. Για την ισχύ των 240 W, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο μειώνεται με την αύξηση του χρόνου μέχρι τα 8 min για λόγο 1/25 g/mL και 5 min για λόγο 1/20 g/mL, από όπου και έπειτα αυξάνεται. Όσον αφορά τον παράγοντα της ισχύος, τα 240 W επιτυγχάνουν υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για χρόνο 2 min, ενώ τα 400 W επιτυγχάνουν υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για χρόνους 5, 8 και 10 min. Όσον αφορά τον λόγο στερεού/υγρό, φαίνεται ότι ο λόγος 1/20 φέρει καλύτερα αποτελέσματα για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων πέρα από τις περιπτώσεις των 240 W, 5 min και 400 W, 2 min.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.16 παραρτήματος) προκύπτει ότι ο χρόνος, η ισχύς και ο λόγος στερεού/υγρό δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Συμπερασματικά, από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα προκύπτει ότι ο χρόνος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση εκχύλισης. Συγκεκριμένα, ο χρόνος 10 min φέρει τη μέγιστη απόδοση εκχύλισης. Οι βέλτιστες συνθήκες για την υδατική εκχύλιση των πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από μικροκύματα φαίνεται να είναι: χρόνος εκχύλισης 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, δηλαδή οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται μέγιστη απόδοση εκχύλισης και ολική απόδοση και ικανοποιητική απόδοση καταβύθισης και πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

Σε αυτές τις συνθήκες, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου παίρνουν τις τιμές που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι τιμές αυτές είναι ικανοποιητικές.

Πίνακας 5.8. Αποτελέσματα ικανότητας απορρόφησης νερού και ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα όταν πραγματοποιείται υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα διάρκειας 10 min, pH 8,0, ισχύος 400 W και λόγου στερεού/υγρό 1/25 g/mL

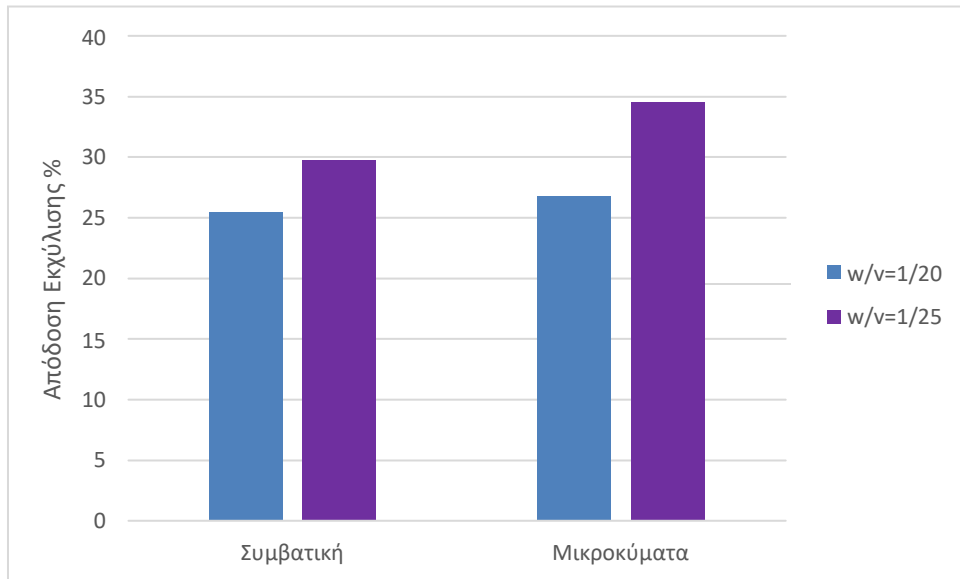
Ικανότητα Απορρόφησης Νερού (g νερού/100 g δείγματος)	Ικανότητα Απορρόφησης Ελαίου (mL ελαίου/100 g δείγματος)
460	773

Ακολουθεί σύγκριση της συμβατικής υδατικής εκχύλισης και υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνονται τα πειράματα της συμβατικής εκχύλισης με συνθήκες: pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C, χρόνος 30 min και λόγος στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL με τα πειράματα της εκχύλισης με μικροκύματα με συνθήκες: pH 8,0, χρόνος 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W και λόγος στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL. Τα βέλτιστα πειράματα και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης είχαν ως λόγο στερεού/υγρό την τιμή 1/25 g/mL. Τα αποτελέσματα των αποδόσεων και του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων για τα πειράματα αυτά έχουν δοθεί σε προηγούμενους πίνακες, αλλά παρατίθενται και στον πίνακα 5.9.

Πίνακας 5.9. Αποτελέσματα ορισμένων πειραμάτων συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με μικροκύματα

Συνθήκες	Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
Συμβατική: pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/20, 30 min	25,45	27,65	7,04	82,01
Συμβατική: pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/25, 30 min	29,76	31,41	9,35	83,5
Εκχύλιση με μικροκύματα: pH 8,0, 10 min, ισχύς 400 W, λόγος 1/20	26,76	17,2	4,6	84,41
Εκχύλιση με μικροκύματα: pH 8,0, 10 min, ισχύς 400 W, λόγος 1/25	34,57	21,26	7,35	71,44

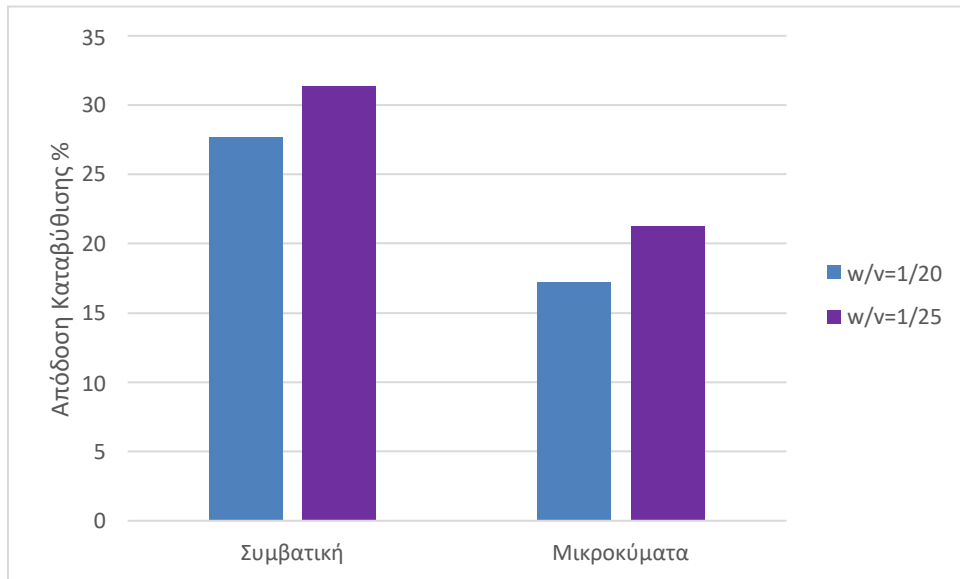
Για τη σύγκριση των αποκρίσεων παρατίθενται και τα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 5.15. Τιμές της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε λόγους στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η απόδοση εκχύλισης κατά την εκχύλιση με μικροκύματα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη απόδοση εκχύλισης κατά τη συμβατική εκχύλιση σε κάθε περίπτωση. Και αυτό διότι με τα μικροκύματα επιτυγχάνεται υψηλότερο ποσοστό αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων της ελαιοκράμβης, με αποτέλεσμα υψηλότερο ποσοστό απελευθέρωσης των πρωτεϊνών προς το εξωτερικό των κυττάρων.

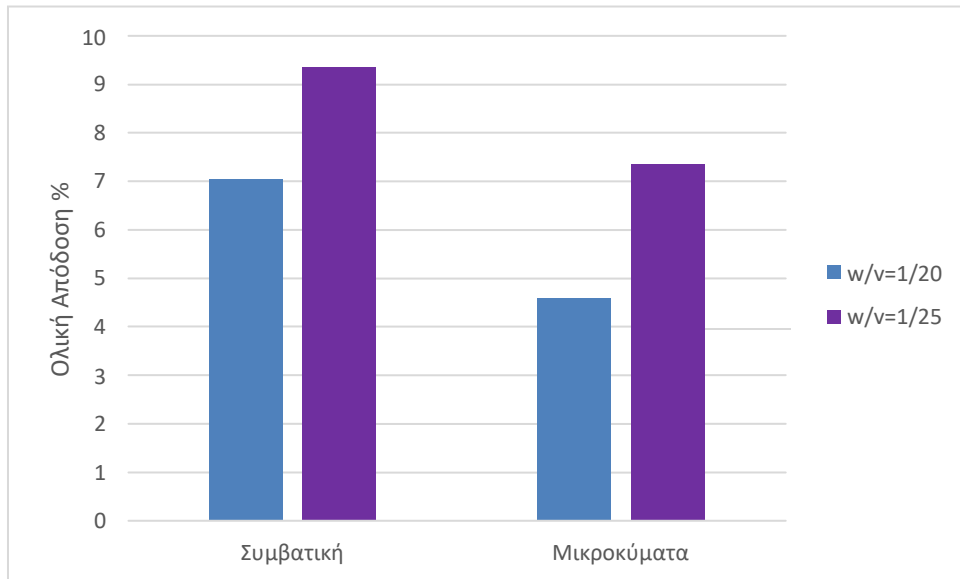
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.17 παραρτήματος) προκύπτει ότι η νέα μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα δεν επιφέρει σημαντικά διαφορετική απόδοση εκχύλισης σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση.



Διάγραμμα 5.16. Τιμές της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε λόγους στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η απόδοση καταβύθισης κατά την εκχύλιση με μικροκύματα είναι μικρότερη από την αντίστοιχη απόδοση καταβύθισης κατά τη συμβατική εκχύλιση σε κάθε περίπτωση.

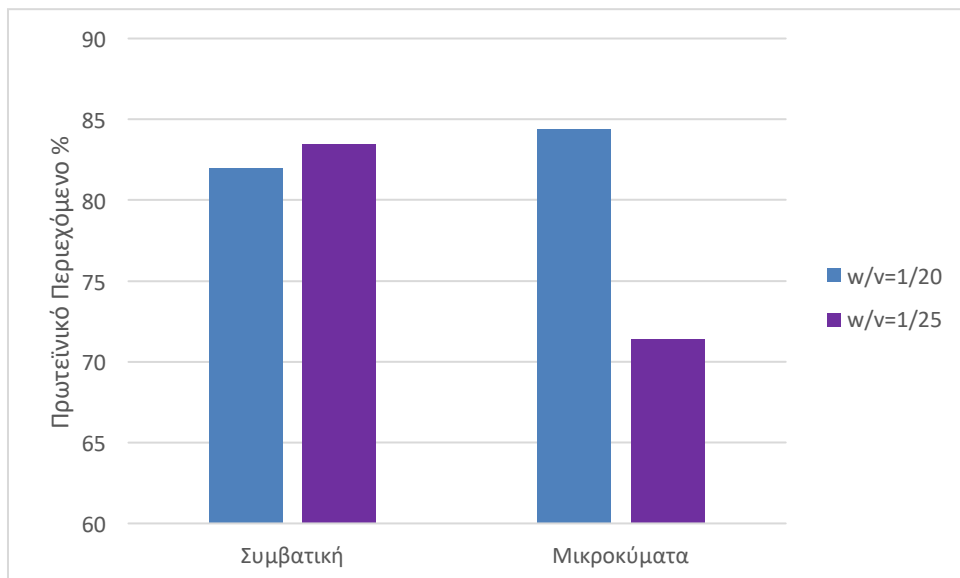
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.18 παραρτήματος) προκύπτει ότι η νέα μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα επιφέρει σημαντικά διαφορετική απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση. Πιο συγκεκριμένα, από τον έλεγχο Duncan για τον παράγοντα της μεθόδου (πίνακας Π.19 παραρτήματος), προκύπτει ότι η συμβατική μέθοδος εκχύλισης διαφέρει σημαντικά από τη μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα, δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 5.17. Τιμές της ολικής απόδοσης της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε λόγους στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL

Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι η ολική απόδοση της διεργασίας κατά την εκχύλιση με μικροκύματα είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη ολική απόδοση κατά τη συμβατική εκχύλιση σε κάθε περίπτωση.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.20 παραρτήματος) προκύπτει ότι η νέα μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα δεν επιφέρει σημαντικά διαφορετική ολική απόδοση της διεργασίας σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση.

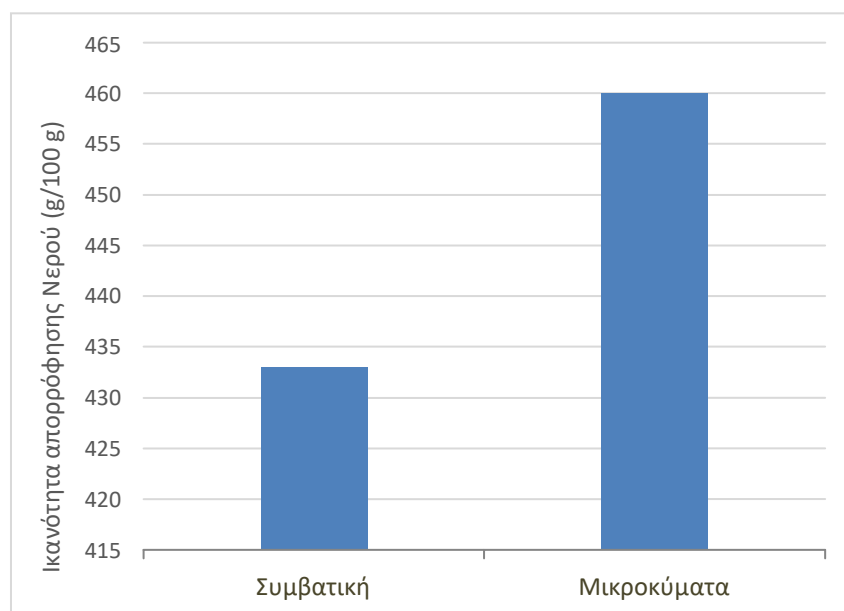


Διάγραμμα 5.18. Τιμές του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε λόγους στερεού/υγρό 1/20 και 1/25 g/mL

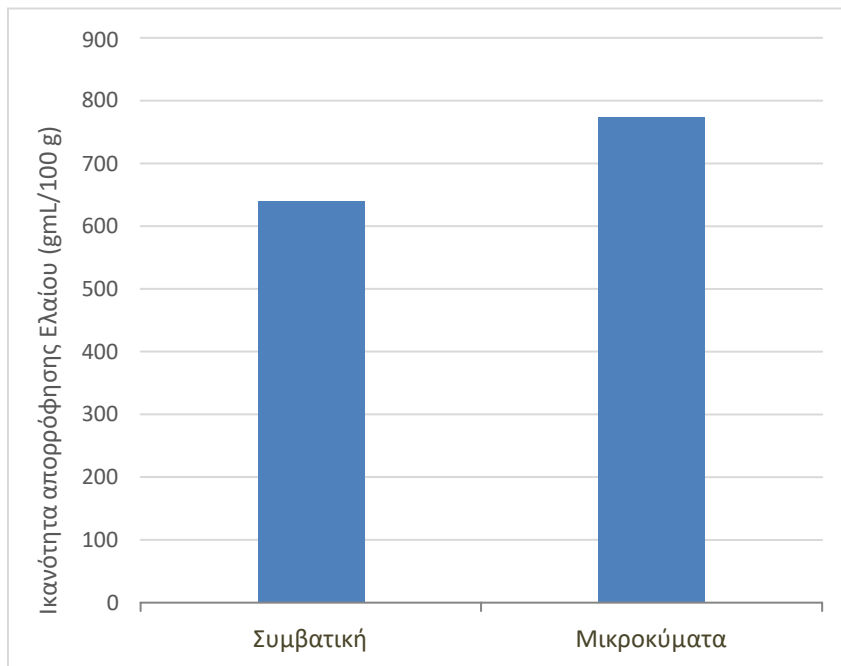
Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι για τις βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης με μικροκύματα και της συμβατικής εκχύλισης, δηλαδή για λόγο στερεού/υγρό 1/25 g/mL, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί εκχύλιση με μικροκύματα είναι χαμηλότερο από όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική εκχύλιση. Αντίθετα, για λόγο στερεού/υγρό 1/20 g/mL το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί εκχύλιση με μικροκύματα είναι υψηλότερο από όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική εκχύλιση.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.21 παραρτήματος) προκύπτει ότι η νέα μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα δεν επιφέρει σημαντικά διαφορετικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση.

Στα παρακάτω διαγράμματα συγκρίνονται οι λειτουργικές ιδιότητες της ικανότητας απορρόφησης νερού και ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων που έχουν προκύψει με συμβατική εκχύλιση (συνθήκες: pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C, χρόνος 30 min και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL) και εκχύλιση με μικροκύματα (συνθήκες: pH 8,0, χρόνος 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL).



Διάγραμμα 5.19. Τιμές της ικανότητας απορρόφησης νερού των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα



Διάγραμμα 5.20. Τιμές της ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων που προκύπτουν από εκχύλιση με μικροκύματα είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες ιδιότητες των υπερσυμπυκνωμάτων που προκύπτουν από συμβατική εκχύλιση. Και αυτό διότι μέσω της εκχύλισης με μικροκύματα συμβαίνουν μεταβολές στις πρωτεΐνες που οφείλονται σε αποκάλυψη υδρόφιλων και υδρόφοβων ομάδων. Λόγω της αποκάλυψης των υδρόφιλων και υδρόφοβων ομάδων, αυξάνεται η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα, αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι με τη χρήση μικροκυμάτων κατά την εκχύλιση επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση εκχύλισης, ολική απόδοση, πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων. Από την άλλη, με χρήση μικροκυμάτων προκύπτει χαμηλότερη απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA προέκυψε ότι μόνο οι τιμές της απόδοσης καταβύθισης όταν έχει πραγματοποιηθεί εκχύλιση με μικροκύματα έχουν σημαντική διαφορά από αυτές της συμβατικής εκχύλισης. Συγκεκριμένα, είναι σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές της απόδοσης καταβύθισης της συμβατικής εκχύλισης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος της ισοηλεκτρικής καταβύθισης ίσως δεν είναι η βέλτιστη μέθοδος καταβύθισης των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης ύστερα από εκχύλιση με μικροκύματα.

5.3.5 Αποτελέσματα εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο

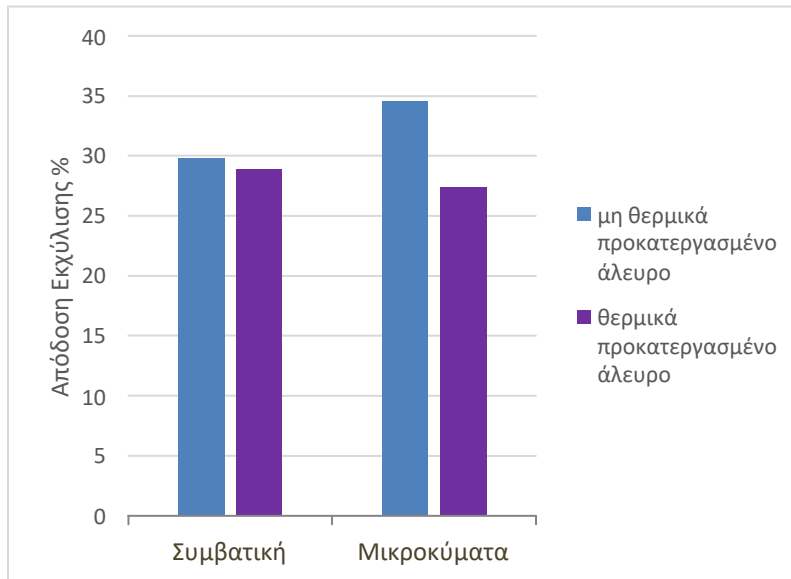
Κατά την πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε σε ορισμένα δείγματα του πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης να πραγματοποιηθεί θερμική κατεργασία πριν το στάδιο της εκχύλισης. Η θερμική προκατεργασία έχει ως στόχο την αύξηση της εκχυλισιμότητας των πρωτεϊνών από τα κύτταρα της ελαιοκράμβης, μέσω της απομάκρυνσης των αντιθρεπτικών παραγόντων και της αδρανοποίησης των αναστολέων ενζύμων. Γενικά, συμβαίνει παρεμπόδιση της εκχύλισης των κύριων κλασμάτων των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης, οι οποίες είναι γλοβουλίνες (25-65%) και αλβουμίνες (20-40%), από αντιθρεπτικούς παράγοντες. Μέσω της θερμικής προκατεργασίας αυξάνεται και η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών.

Στον πίνακα 5.10. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης. Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα με συμβατική εκχύλιση με συνθήκες ίδιες με τις βέλτιστες της συμβατικής εκχύλισης που έχουν βρεθεί προηγουμένως και ένα πείραμα με εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με συνθήκες ίδιες με τις βέλτιστες της εκχύλισης με μικροκύματα που επίσης έχουν βρεθεί.

Πίνακας 5.10. Αποτελέσματα υδατικής εκχύλισης από θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης

Συνθήκες	Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
Συμβατική: pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/25, 30 min	28,90	33,47	9,67	83,66
Εκχύλιση με μικροκύματα: pH 8,0, 10 min, ισχύς 400W, λόγος 1/25	27,39	28,71	7,86	74,36

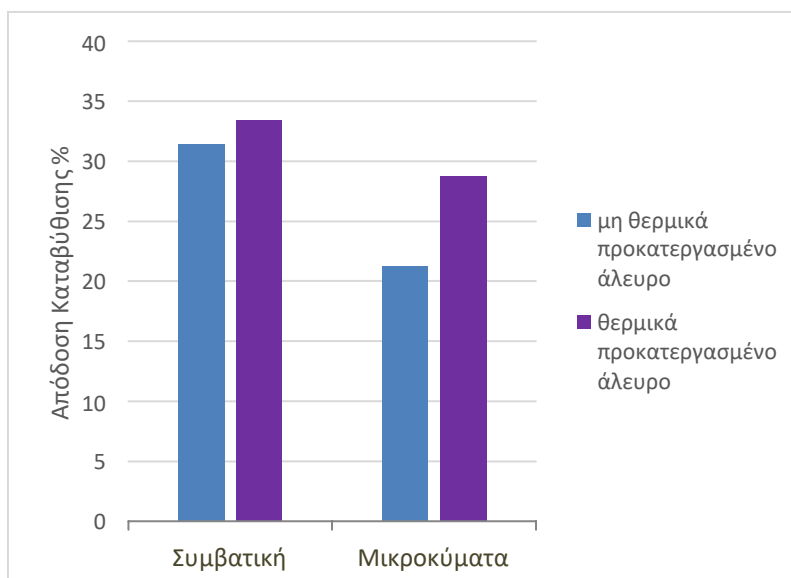
Τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη συγκρίνονται μέσω διαγραμμάτων με τα αντίστοιχα πειράματα συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα χρησιμοποιώντας ύλη που δεν έχει υποστεί θερμική προκατεργασία.



Διάγραμμα 5.21. Σύγκριση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι όταν χρησιμοποιείται θερμικά προκατεργασμένο άλευρο ελαιοκράμβης η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών ελαττώνεται. Αυτό ισχύει και για τη συμβατική εκχύλιση και για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

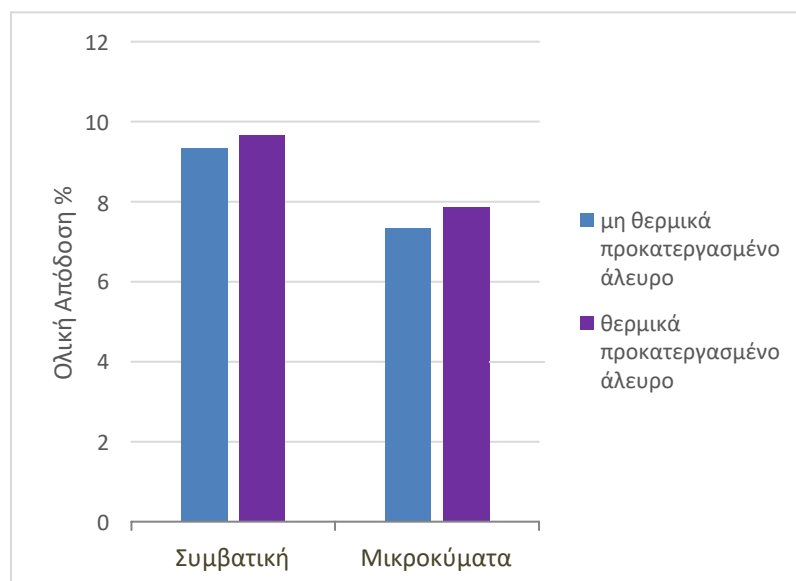
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.22 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση εκχύλισης της συμβατικής υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών και της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.22. Σύγκριση της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης

Σε αντίθεση με την απόδοση εκχύλισης, η απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη είναι υψηλότερη από τη μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη και για τη συμβατική και για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

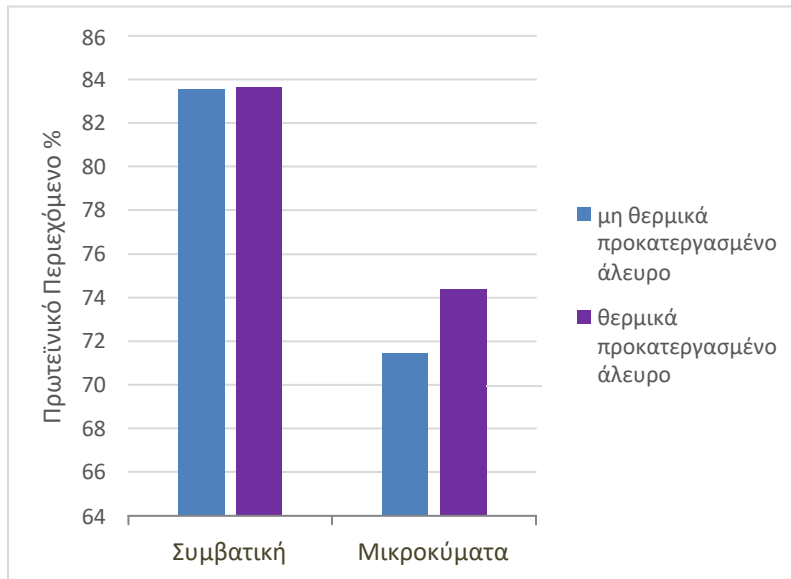
Όμως, από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.23 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.23. Σύγκριση της ολικής απόδοσης της διεργασίας από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι η ολική απόδοση της διεργασίας όταν χρησιμοποιείται θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης είναι υψηλότερη και για τη συμβατική εκχύλιση και για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.24 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.24. Σύγκριση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης

Παρατηρείται ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν εκχυλίζεται θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν εκχυλίζεται μη θερμικά προκατεργασμένο άλευρο και για τη συμβατική εκχύλιση και για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

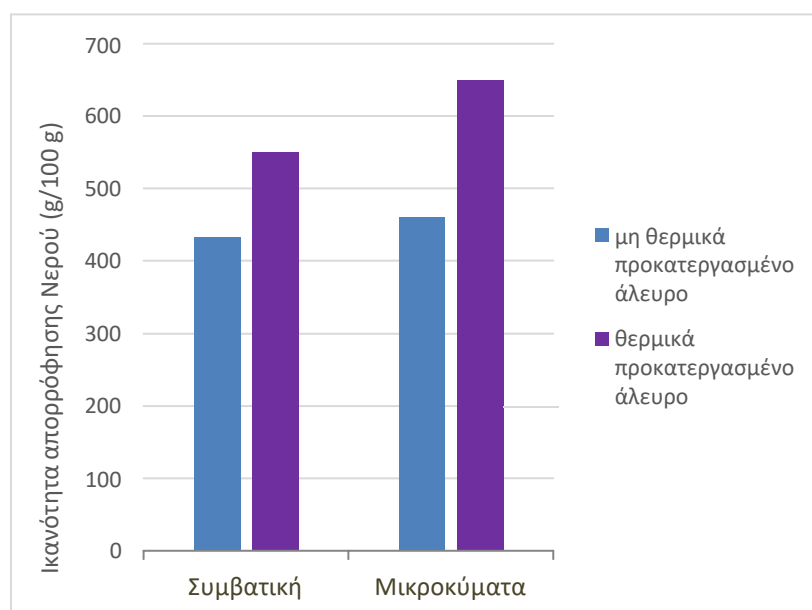
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.25 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Η ικανότητα απορρόφησης νερού και η ικανότητα απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων που προκύπτουν από συμβατική υδατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

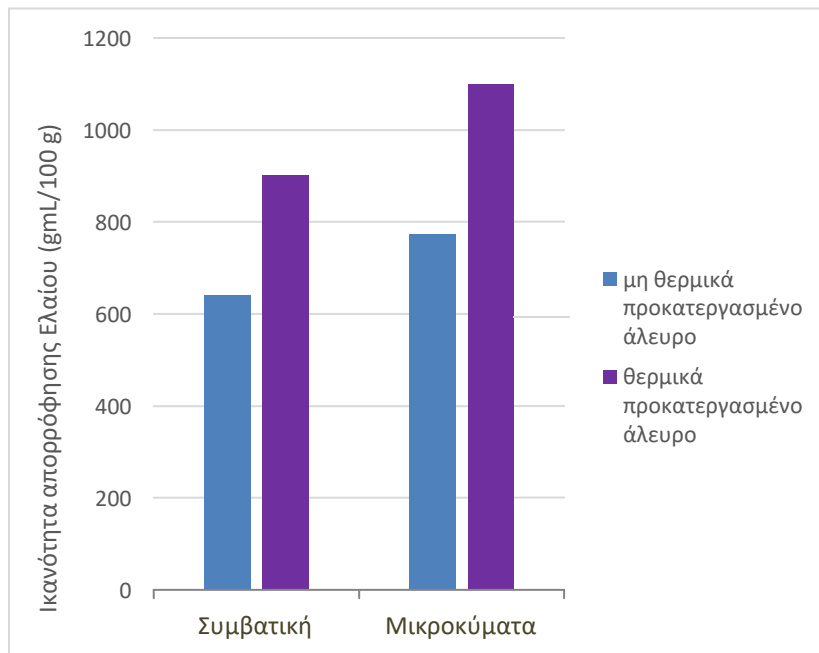
Πίνακας 5.11. Αποτελέσματα ικανότητας απορρόφησης νερού και ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά κατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο

Συνθήκες	Ικανότητα Απορρόφησης Νερού (g νερού/100 g δείγματος)	Ικανότητα Απορρόφησης Ελαίου (mL ελαίου/100 g δείγματος)
Συμβατική: pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/25, 30 min	550	900
Εκχύλιση με μικροκύματα: pH 8,0, 10 min, ισχύς 400 W, λόγος 1/25	650	1.100

Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις αντίστοιχες της συμβατικής εκχύλισης και της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα κατά τις οποίες δεν έχει χρησιμοποιηθεί θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη.



Διάγραμμα 5.25. Σύγκριση της ικανότητας απορρόφησης νερού των υπερσυμπυκνωμάτων από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης



Διάγραμμα 5.26. Σύγκριση της ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων από εκχύλιση θερμικά προκατεργασμένης και μη πρώτης ύλης

Από τα παραπάνω διαγράμματα γίνεται αντιληπτό ότι η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν εκχυλίζεται θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη είναι υψηλότερες σε σχέση με τις εκχυλίσεις στις οποίες δεν έχει χρησιμοποιηθεί θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.26 & Π.27 παραρτήματος) προκύπτει ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Από την παραπάνω ανάλυση συμπεραίνεται ότι η θερμική προκατεργασία της πρώτης ύλης επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα για την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών, την ολική απόδοση της διεργασίας και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, την ικανότητα απορρόφησης νερού και ικανότητα απορρόφησης ελαίου των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, αλλά όχι για την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών. Από την άλλη, προκύπτει μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA ότι η θερμική προκατεργασία ή μη της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για καμία από τις αποκρίσεις. Για αυτόν τον λόγο, το στάδιο της θερμικής προκατεργασίας της πρώτης ύλης θα αποφευχθεί στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Αξίζει, όμως, περαιτέρω εξέταση στο στάδιο αυτό, λόγω των καλών αποτελεσμάτων όσον αφορά στη διαδικασία καταβύθισης και παραλαβής υπερσυμπυκνωμάτων υψηλής καθαρότητας. Επιπλέον, αξίζει να εξεταστεί η θερμοκρασία και ο χρόνος της θερμικής προκατεργασίας, κατά πόσο έχουν επίδραση στις αποκρίσεις της πειραματικής διαδικασίας, ειδικά στο στάδιο της εκχύλισης των πρωτεϊνών.

5.3.6 Αποτελέσματα εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ενζυμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο

Κατά την πειραματική διαδικασία δοκιμάστηκε η προσθήκη ενός σταδίου ενζυμικής προκατεργασίας του πρωτεϊνικού αλεύρου πριν από το στάδιο της εκχύλισης. Η προκατεργασία με ένζυμα στοχεύει στην ενζυμική κατάλυση της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων της ελαιοκράμβης. Η ενζυμική αυτή προκατεργασία πραγματοποιήθηκε με χρήση κυτταρινάσης Cellic Ctec2 που καταλύει τα κυτταρινούχα συστατικά του υποστρώματος, ημικυτταρινάσης Cellic Htec που καταλύει τα ημικυτταρινούχα συστατικά του υποστρώματος και μείγματος κυτταρινάσης Cellic Ctec2 και ημικυτταρινάσης Cellic Htec που καταλύει τα κυτταρινούχα και τα ημικυτταρινούχα συστατικά του υποστρώματος.

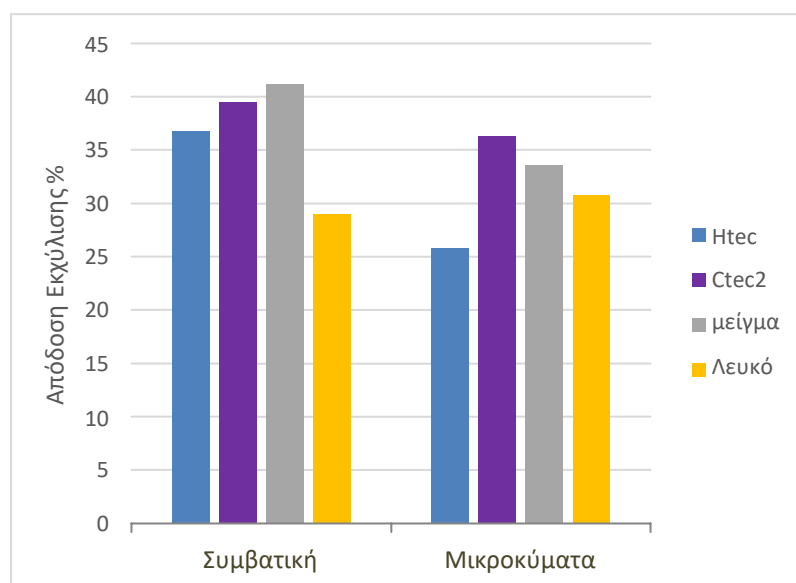
Στον πίνακα 5.12. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υδατικής εκχύλισης των πρωτεϊνών και της εκχύλισης των πρωτεϊνών υποβοηθούμενης από μικροκύματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ενζυμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα για τα ένζυμα Cellic Htec, Cellic Ctec2, μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2 και για λευκό δείγμα με συμβατική εκχύλιση με συνθήκες ίδιες με τις βέλτιστες της συμβατικής εκχύλισης που έχουν βρεθεί προηγουμένως. Ομοίως, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα για τα ένζυμα Cellic Htec, Cellic Ctec2, μείγμα Cellic Htec και Cellic Ctec2 και για λευκό δείγμα με εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με συνθήκες ίδιες με τις βέλτιστες της εκχύλισης με μικροκύματα που έχουν βρεθεί.

Πίνακας 5.12. Αποτελέσματα υδατικής εκχύλισης (συμβατικής: pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/25, 30min και με μικροκύματα: pH 8,0, 10 min, ισχύς 400 W, λόγος 1/25) από ενζυμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο ελαιοκράμβης

Συνθήκες	Απόδοση Εκχύλισης	Απόδοση Καταβύθισης	Ολική Απόδοση	Πρωτεϊνικό Περιεχόμενο των p.i.
Συμβατική Htec	36,82	13,50	4,97	72,67
Συμβατική Ctec2	39,49	14,52	5,73	60,51
Συμβατική μείγμα	41,20	12,11	4,99	73,81
Συμβατική λευκό	28,94	11,24	3,25	64,16
Μικροκύματα Htec	25,80	15,26	3,94	72,62
Μικροκύματα Ctec2	36,32	17,56	6,38	71,59
Μικροκύματα μείγμα	33,60	13,94	4,68	60,45
Μικροκύματα λευκό	30,80	17,77	5,47	70,37

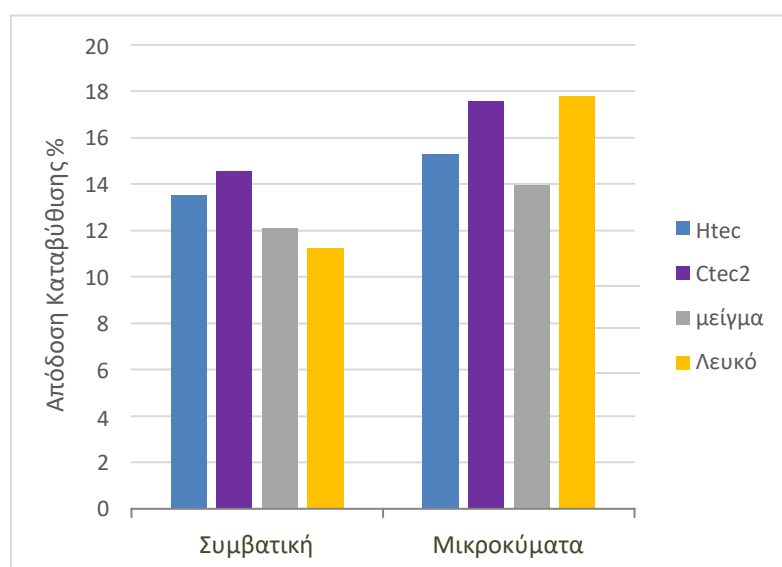
Από τον πίνακα παρατηρείται ότι οι μέγιστες αποδόσεις και το μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας κυρίως είτε ένζυμο Ctec2, είτε μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2. Για βαθύτερη ανάλυση, παρατίθενται διαγράμματα στα οποία συγκρίνονται οι αποκρίσεις της συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα για τα διάφορα ένζυμα. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα για το είδος του ενζύμου που επιφέρει τις υψηλότερες

αποδόσεις και υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των τελικών υπερσυμπυκνωμάτων σε κάθε περίπτωση. Επίσης, παρατηρείται αν υπάρχει διαφορά των τιμών των αποκρίσεων με το λευκό δείγμα στο οποία δεν έχει χρησιμοποιηθεί ένζυμο.



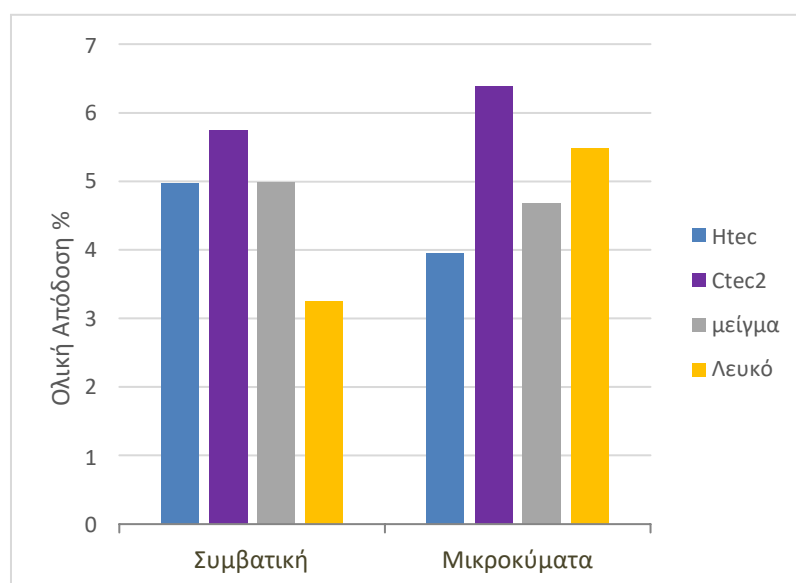
Διάγραμμα 5.27. Σύγκριση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών από εκχύλιση ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω διάφορων ενζύμων

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η προκατεργασία με μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2 φέρει τη μέγιστη απόδοση εκχύλισης στη συμβατική εκχύλιση και η προκατεργασία με ένζυμο Ctec2 φέρει τη μέγιστη απόδοση εκχύλισης στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Στη συμβατική εκχύλιση παρατηρείται διαφορά της απόδοσης εκχύλισης του λευκού δείγματος από τις υπόλοιπες αποδόσεις εκχύλισης, ενώ στην εκχύλιση με μικροκύματα δεν παρατηρείται διαφορά στην απόδοση εκχύλισης μεταξύ των εκχυλίσεων με ένζυμο και της εκχύλισης με λευκό δείγμα.



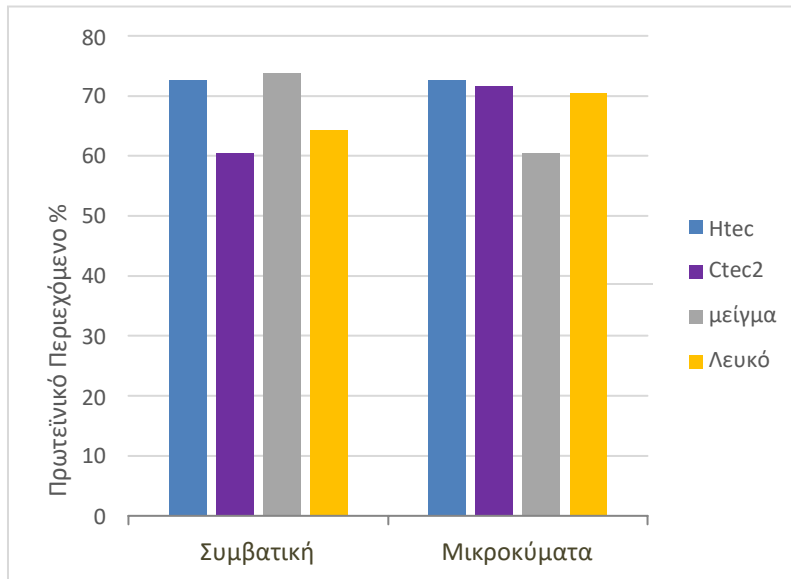
Διάγραμμα 5.28. Σύγκριση της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν πραγματοποιείται εκχύλιση ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω διάφορων ενζύμων

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η προκατεργασία με ένζυμο Ctec2 φέρει τη μέγιστη απόδοση καταβύθισης όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και η προκατεργασία χωρίς ένζυμο και με ένζυμο Ctec2 φέρουν τις μέγιστες αποδόσεις καταβύθισης όταν πραγματοποιείται εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Στη συμβατική εκχύλιση παρατηρείται διαφορά της απόδοσης καταβύθισης όταν εκχυλίζεται λευκό δείγμα από τις υπόλοιπες αποδόσεις καταβύθισης, ενώ στην εκχύλιση με μικροκύματα δεν παρατηρείται διαφορά στην απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών μεταξύ των εκχυλίσεων με ένζυμο και της εκχύλισης με λευκό δείγμα.



Διάγραμμα 5.29. Σύγκριση της ολικής απόδοσης της διεργασίας όταν πραγματοποιείται εκχύλιση ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω διάφορων ενζύμων

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η προκατεργασία με ένζυμο Ctec2 φέρει τη μέγιστη ολική απόδοση όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Στη συμβατική εκχύλιση παρατηρείται διαφορά της ολικής απόδοσης όταν εκχυλίζεται λευκό δείγμα από τις υπόλοιπες ολικές αποδόσεις, ενώ στην εκχύλιση με μικροκύματα παρατηρείται διαφορά στην ολική απόδοση μόνο της εκχύλισης με ένζυμο Ctec2 από την εκχύλιση με λευκό δείγμα.



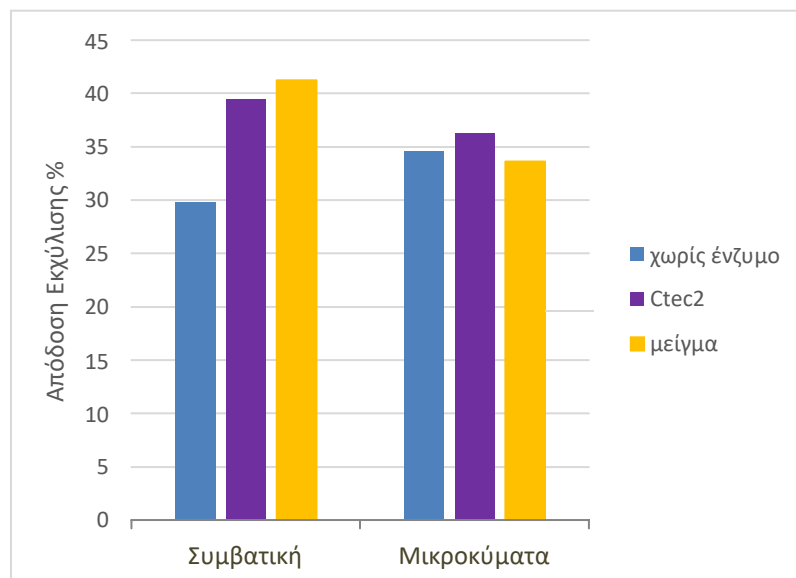
Διάγραμμα 5.30. Σύγκριση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν πραγματοποιείται εκχύλιση ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω διάφορων ενζύμων

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η προκατεργασία με μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2 φέρει το μέγιστο πρωτεϊνικό περιεχόμενο όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και η προκατεργασία με ένζυμο Htec και με ένζυμο Ctec2 φέρουν τα μέγιστα πρωτεϊνικά περιεχόμενα όταν πραγματοποιείται εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Στη συμβατική εκχύλιση παρατηρείται διαφορά του πρωτεϊνικού περιεχομένου μόνο στις εκχυλίσεις με ένζυμο Htec και μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2 από την εκχύλιση με λευκό δείγμα. Αντίθετα, στην εκχύλιση με μικροκύματα παρατηρείται διαφορά του πρωτεϊνικού περιεχομένου μόνο στις εκχυλίσεις με ένζυμο Htec και ένζυμο Ctec2 από την εκχύλιση με λευκό δείγμα.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι τις μέγιστες αποκρίσεις φέρουν κυρίως το ένζυμο Ctec2 και το μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2. Στη συμβατική εκχύλιση παρατηρείται διαφορά των αποκρίσεων όταν χρησιμοποιείται λευκό δείγμα κατά την ενζυμική προκατεργασία. Αντίθετα, στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα παρατηρείται διαφορά των αποκρίσεων μόνο κατά την εκχύλιση με χρήση ενζύμου Ctec2 από την εκχύλιση με λευκό δείγμα. Αυτή η διαφορά παρατηρείται περισσότερο στην απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών. Στην απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων, δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά από το λευκό δείγμα. Και αυτό διότι κατά την εκχύλιση ενζυμικά προκατεργασμένου αλεύρου με μικροκύματα, η μέθοδος της ισοηλεκτρικής καταβύθισης ίσως δεν είναι η βέλτιστη μέθοδος καταβύθισης των πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δεν εξετάζονται άλλες μέθοδοι καταβύθισης, όμως αξίζει να εξεταστούν λόγω της υψηλής απόδοσης εκχύλισης που φέρει η προκατεργασία με ένζυμο.

Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των βέλτιστων αποτελεσμάτων της συμβατικής υδατικής εκχύλισης (συνθήκες: pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C, λόγος στερεού/υγρό 1/25

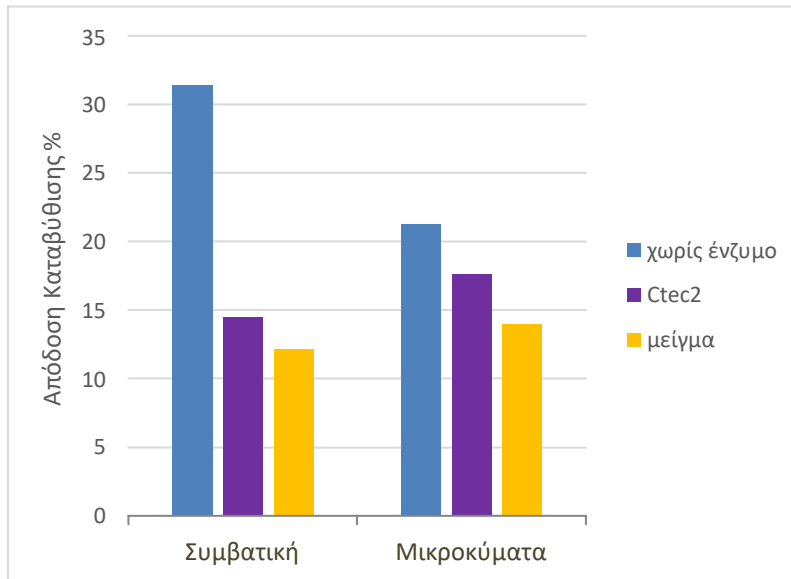
g/mL, χρόνος 30 min) και της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα (συνθήκες: pH 8,0, χρόνος 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W, λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL) με την αντίστοιχη συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα αφού έχει πραγματοποιηθεί ενζυμική προκατεργασία των δειγμάτων με την κυτταρινάση Ctec2 και το μείγμα κυτταρινάσης Ctec2 και ημικυτταρινάσης Htec.



Διάγραμμα 5.31. Σύγκριση της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών της συμβατικής εκχύλισης και της εκχύλισης με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Με τη χρήση ενζύμων παρατηρείται αύξηση της απόδοσης εκχύλισης κατά τη συμβατική εκχύλιση, αλλά και κατά την εκχύλιση με μικροκύματα μόνο με τη χρήση του ενζύμου Ctec2.

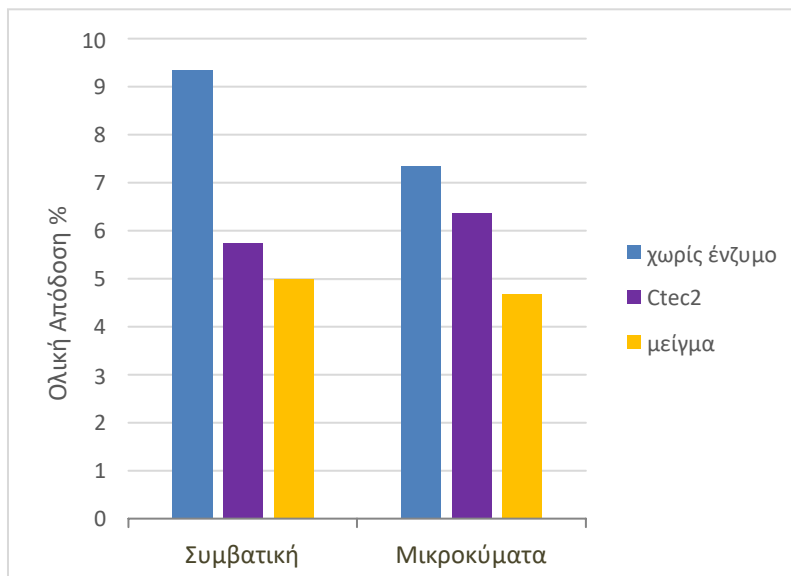
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.28 παραρτήματος) προκύπτει ότι η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.32. Σύγκριση της απόδοσης καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Με τη χρήση ενζύμων παρατηρείται μείωση της απόδοσης καταβύθισης κατά τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση με μικροκύματα.

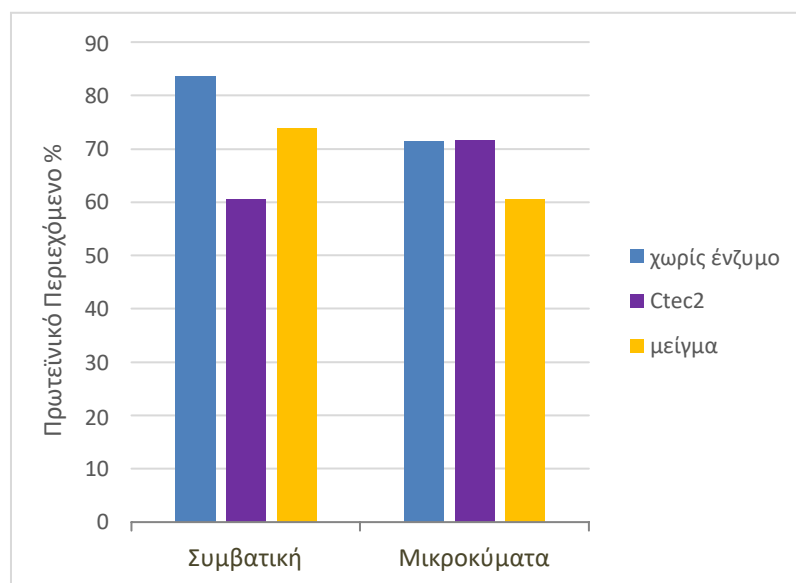
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.29 παραρτήματος) προκύπτει ότι η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.33. Σύγκριση της ολικής απόδοσης της διεργασίας όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Με τη χρήση ενζύμων παρατηρείται μείωση της ολικής απόδοσης της διεργασίας κατά τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση με μικροκύματα.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.30 παραρτήματος) προκύπτει ότι η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ολική απόδοση της διεργασίας όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.



Διάγραμμα 5.34. Σύγκριση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Με τη χρήση ενζύμων παρατηρείται μείωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των υπερσυμπυκνωμάτων κατά τη συμβατική εκχύλιση. Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων με προκατεργασία με ένζυμο Ctec2 και χωρίς προκατεργασία βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο.

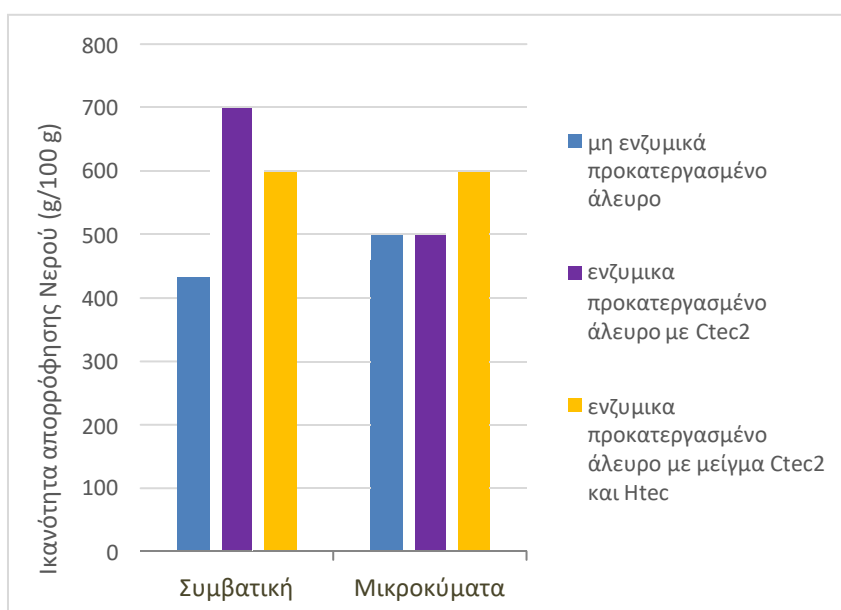
Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.31 παραρτήματος) προκύπτει ότι η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Όσον αφορά τις λειτουργικές ιδιότητες, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων που έχουν προκύψει από συμβατική εκχύλιση ή εκχύλιση με μικροκύματα ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

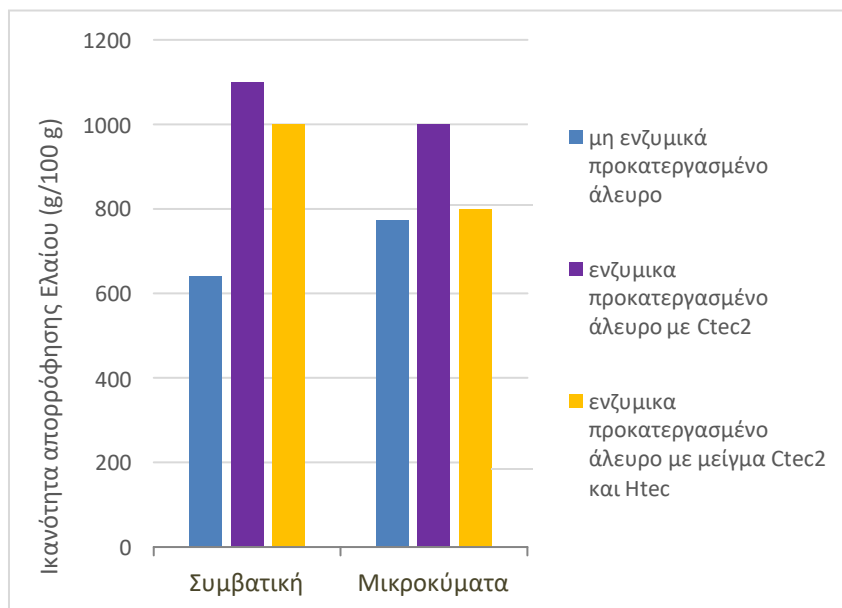
Πίνακας 5.13. Αποτελέσματα ικανότητας απορρόφησης νερού και ελαίου από τα πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση (pH 9,0, 50 °C, λόγος 1/25, 30 min) και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (pH 8,0, 10 min, ισχύς 400 W, λόγος 1/25) χρησιμοποιώντας ενζυμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό άλευρο μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Συνθήκες	Ικανότητα Απορρόφησης Νερού (g νερού/100 g δείγματος)	Ικανότητα Απορρόφησης Ελαίου (mL ελαίου/100 g δείγματος)
Συμβατική-Ctec2	700	1.100
Συμβατική-μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2	600	1.000
Μικροκύματα-Ctec2	500	1.000
Μικροκύματα-μείγμα ενζύμων Htec και Ctec2	600	800

Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις αντίστοιχες της συμβατικής εκχύλισης και της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα κατά τις οποίες δεν έχει πραγματοποιηθεί ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης.



Διάγραμμα 5.35. Σύγκριση της ικανότητας απορρόφησης νερού των υπερσυμπυκνωμάτων όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2



Διάγραμμα 5.36. Σύγκριση της ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης μέσω του ενζύμου Ctec2 και του μείγματος ενζύμων Htec και Ctec2

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης είναι μεγαλύτερη από την ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων που προκύπτουν από εκχύλιση δίχως το στάδιο της ενζυμικής προκατεργασίας.

Από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA (πίνακας Π.32 & Π.33 παραρτήματος) προκύπτει ότι η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η προκατεργασία με ένζυμα φέρει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων, αλλά χαμηλότερη απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων. Όμως, η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για καμία από τις αποκρίσεις σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης ANOVA.

Συμπεράσματα-Προτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η εκχύλιση πρωτεϊνών και η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων από άλευρο ελαιοκράμβης. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε κυρίως μέσω της συμβατικής εκχύλισης και της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα. Επιπλέον, μελετήθηκε το στάδιο της εργαστηριακής απελαίωσης του αλεύρου, το στάδιο της θερμικής και ενζυμικής προκατεργασίας του αλεύρου και η χρήση ευτηκτικού διαλύτη <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>> κατά τη συμβατική εκχύλιση. Μετά την εκχύλιση, ακολουθεί το στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο που βρέθηκε πειραματικά με 4,25.

Το ποσοστό των πρωτεϊνών στην πρώτη ύλη είναι ίσο με 39,47% (ξ.β.), τιμή που είναι σύμφωνη με τη βιβλιογραφία και δείχνει ότι το άλευρο ελαιοκράμβης αποτελεί ικανοποιητική πηγή πρωτεϊνών. Οι φυτικές πρωτεΐνες της ελαιοκράμβης μπορούν να ενσωματωθούν σε διάφορα τρόφιμα ώστε να αυξήσουν το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες. Παρακάτω αναλύονται οι μέθοδοι εκχύλισης των πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη που εξετάστηκαν.

Στη συμβατική εκχύλιση βρέθηκε ότι σημαντικοί παράγοντες για την απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών είναι η θερμοκρασία και το pH, με την θερμοκρασία των 50 °C και την τιμή pH 9,0 να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση καταβύθισης. Από την άλλη, σημαντικός παράγοντας για την ολική απόδοση της διεργασίας είναι το pH, με την τιμή pH 9,0 να δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην ολική απόδοση. Οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων είναι: pH 9,0, θερμοκρασία 50 °C και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, οι οποίες δίνουν απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση και πρωτεϊνικό περιεχόμενο ίσα με 29,76%, 31,41%, 9,35% και 83,50%, αντίστοιχα. Επιπλέον, κατά τη συμβατική εκχύλιση οι τιμές της ικανότητας απορρόφησης νερού και ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων είναι ικανοποιητικές.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων μέσω συμβατικής εκχύλισης εργαστηριακά απελαιωμένου πρωτεϊνικού αλεύρου. Βρέθηκε ότι το στάδιο της απελαίωσης δεν επηρεάζει σημαντικά καμία από τις αποκρίσεις. Έτσι, επιλέχθηκε να μην γίνει η προσθήκη του σταδίου αυτού. Γίνεται αντιληπτό ότι το ποσοστό του ελαίου στο πρωτεϊνικό άλευρο είναι χαμηλό (3,2483% ξ.β.) και έτσι δεν επηρεάζεται το στάδιο της εκχύλισης από αυτό.

Στη συμβατική εκχύλιση, μελετήθηκε και η αντικατάσταση του απιονισμένου νερού που χρησιμοποιείται ως διαλύτης από μείγμα ευτηκτικού διαλύτη <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>>. Η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών βρέθηκε ίση με 39,55%, αλλά υπάρχει απόκλιση στον υπολογισμό της λόγω της δυσκολίας ξήρανσης του στερεού υπολείμματος, η μάζα του οποίου σε ξ.β. συμμετέχει στον υπολογισμό της. Αυτό οφείλεται στο υψηλό ιξώδες του ευτηκτικού διαλύτη <<κιτρικό οξύ-γλυκόζη>>. Λόγω του υψηλού αυτού ιξώδους, δεν είναι δυνατή και η ισοηλεκτρική καταβύθιση των πρωτεϊνών και η παραλαβή

πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Αξίζει να μελετηθεί και διαφορετική αναλογία κιτρικού οξέος, γλυκόζης και νερού κατά την παρασκευή του ευτηκτικού μείγματος. Για παράδειγμα, μπορεί να εξεταστεί η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας νερού, ώστε να μειωθεί το ιξώδες του διαλύτη και να γίνει ευκολότερη η χρήση του. Διαφορετικά, αξίζει και η αναζήτηση νέων μεθόδων καταβύθισης των πρωτεϊνών, όπως η καταβύθιση με άλατα, η υπερδιήθηση και η συγκαταβύθιση, αλλά και η αναζήτηση διαφορετικών συστημάτων ευτηκτικών διαλυτών.

Μία νέα μέθοδος εκχύλισης που μελετήθηκε είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Βρέθηκε ότι σημαντικός παράγοντας για την απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών είναι ο χρόνος, με τον χρόνο 10 min να διαφέρει σημαντικά από τον χρόνο 2 min και να δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση εκχύλισης. Οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων είναι: χρόνος εκχύλισης 10 min, ισχύς μικροκυμάτων 400 W και λόγος στερεού/υγρό 1/25 g/mL, οι οποίες δίνουν απόδοση εκχύλισης, απόδοση καταβύθισης, ολική απόδοση και πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερσυμπυκνώματος ίσα με 34,57%, 21,26%, 7,35% και 71,44%, αντίστοιχα. Οι τιμές της ικανότητας απορρόφησης νερού και ικανότητας απορρόφησης ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες κατά τη συμβατική εκχύλιση. Σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης, η εκχύλιση με μικροκύματα επιφέρει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών, ολική απόδοση της διεργασίας, πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων. Όμως, η απόδοση καταβύθισης κατά την εκχύλιση με μικροκύματα είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη απόδοση καταβύθισης κατά τη συμβατική εκχύλιση. Άρα, θα μπορούσε να μελετηθεί κάποια διαφορετική μέθοδος απομόνωσης των πρωτεϊνών για την παραλαβή των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων.

Επιπλέον, μελετήθηκε η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων από θερμικά προκατεργασμένο πρωτεϊνικό αλεύρο ελαιοκράμβης μέσω συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης με μικροκύματα. Βρέθηκε ότι το στάδιο της θερμικής προκατεργασίας της πρώτης ύλης δεν επηρεάζει σημαντικά καμία από τις αποκρίσεις. Όμως, επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα για όλες τις αποκρίσεις, πέρα της απόδοσης εκχύλισης των πρωτεϊνών. Επειδή η απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών δεν αυξήθηκε προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητική απομάκρυνση των αντιθρεπτικών παραγόντων της ελαιοκράμβης. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, το στάδιο της θερμικής προκατεργασίας του αλεύρου ελαιοκράμβης παραλείπεται. Αξίζει, όμως να εξεταστεί η θερμοκρασία και ο χρόνος της θερμικής προκατεργασίας, όσον αφορά την επίδραση που θα έχουν στις αποκρίσεις.

Τέλος, μελετήθηκε το στάδιο της ενζυμικής προκατεργασίας του πρωτεϊνικού αλεύρου ελαιοκράμβης. Κατά τη συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα, υψηλότερες τιμές των αποκρίσεων έφερε η κυτταρινάση Ctec2 και το μείγμα κυτταρινάσης Ctec2 και ημικυτταρινάσης Htec. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ελαιοκράμβης ίσως αποτελείται από περισσότερα κυτταρινούχα συστατικά, παρά ημικυτταρινούχα συστατικά. Σε σχέση με

τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση με μικροκύματα δίχως το στάδιο της ενζυμικής προκατεργασίας, η προκατεργασία με ένζυμα φέρει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των πρωτεϊνών και ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου των υπερσυμπυκνωμάτων, αλλά χαμηλότερη απόδοση καταβύθισης των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικό περιεχόμενο των υπερσυμπυκνωμάτων. Η ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για καμία από τις αποκρίσεις.

Γενικά, οι αποδόσεις εκχύλισης των πρωτεϊνών δεν ήταν υψηλές λόγω της παρεμπόδισης της εκχύλισης των κύριων κλασμάτων πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης (γλοβουλίνες και αλβουμίνες) από αντιθρεπτικούς παράγοντες. Για αυτό, πρέπει να επαναεξεταστεί το στάδιο της θερμικής προκατεργασίας της πρώτης ύλης με σκοπό την απομάκρυνση των αντιθρεπτικών παραγόντων. Τέλος, πρέπει να αναζητηθούν νέες μέθοδοι απομόνωσης των εκχυλισμένων πρωτεϊνών ή και άλλες μέθοδοι εκχύλισης των πρωτεϊνών της ελαιοκράμβης, όπως εκχύλιση με υπέρηχους, παλμικά ηλεκτρικά πεδία, ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας κλπ. Σε αυτές τις μεθόδους εκχύλισης, πρέπει να βελτιστοποιηθούν όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν τις αποκρίσεις. Επιπλέον, μπορούν να μετρηθούν και άλλες λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, όπως η αφριστική και η γαλακτωματοποιητική ιδιότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexandre E.M.C., Moreira S.A., Castro L.M.G., Pintado M., Saraiva J.A.
Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions
Food Reviews International, 34 (2018), pp. 581-612
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F.
Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review
Journal of Food Engineering, 117 (2013), pp. 426-436
- Barba F.J., Boussetta N., Vorobiev E.
Emerging technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rapeseed press-cake: effect of high voltage electrical discharges
Innovative Food Science & Emerging Technology, 31 (2015), pp. 67-72
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P.
Χημεία Τροφίμων
Τέταρτη έκδοση, Τζιόλα, Αθήνα (2012)
- Boussetta N., Vorobiev E.
Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review
Comptes Rendus Chimie, 17 (2014), pp. 197-203
- Chemat F., Cravotto G.
Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds
Springer, New York (2013)
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M.
Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review
Ultrasonics Sonochemistry, 34 (2017), pp. 540-560
- Choi I., Choi S.J., Chun J.K., Moon T.W.
Extraction yield of soluble protein and microstructure of soybean affected by microwave heating
Journal of Food Processing Preservation, 30 (2006), pp. 407-419
- Contreras M. del M., Lama-Muñoz A., Manuel Gutiérrez-Pérez J., Espínola F., Moya M., Castro E.
Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status
Bioresource Technology, 280 (2019), pp. 459-477
- Dai Y., Spronsen J., Witkamp G.J., Verpoorte R., Choi Y.H.

Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology

Analytica Chimica Acta, 766 (2013), pp. 61-68

Damodaran S.

Amino Acids, Peptides and Proteins

Fennema's Food Chemistry, Fifth edition, CRC Press, Taylor & Francis Group (2017), pp. 235-356

Dong X.Y., Guo L.L., Wei F., Li J.F., Jiang M.L., Li G.M., Zhao Y.D., Chen H.

Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation

Journal of the Science of Food and Agriculture, 91 (2011), pp. 1488-1498

Ekezie F.-G.C., Sun D.-W., Cheng J.-H.

Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: a review of latest developments

Trends in Food Science & Technology, 67 (2017), pp. 160-172

Esclapez M.D., García-Pérez J.V., Mulet A., Cárcel J.A.

Ultrasound-assisted extraction of natural products

Food Engineering Reviews, 3 (2011), pp. 108-120

Fetzer A., Herfellner T., Stäbler A., Menner M., Eisner P.

Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake

Industrial Crops and Products, 112 (2018), pp. 236-246

Gençdağ E., Görgüç A., Yılmaz F.M.

Recent Advances in the Recovery Techniques of Plant-Based Proteins from Agro-Industrial By-Products

Food Reviews International, 37 (2020), pp. 447-468

Gharib-Bibalan S.

High value-added products recovery from sugar processing by-products and residuals by green technologies: opportunities, challenges, and prospects

Food Engineering Reviews, 10 (2018), pp. 95-111

Görgüç A., Bircan C., Yılmaz F.M.

Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds

Food Chemistry, 283 (2019), pp. 637-645

Grudniewska A., Melo E.M., Chan A., Gniłka R., Boratyński F., Matharu A.S.

Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: A biorefinery approach

ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6 (2018), pp. 15791-15800

Gunstone F.

Rapeseed and Canola Oil Production, Processing, Properties and Uses

John Wiley & Sons, New York (2009)

Heuze V., Tran G., Sauvant D., Lessire M., Lebas F., 2019

Rapeseeds

Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, a program by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO

<https://www.feedipedia.org/node/15617>

Heuze V., Tran G., Sauvant D., Lessire M., Lebas F., 2020

Rapeseed Meal

Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, a program by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO

<https://www.feedipedia.org/node/52>

Jeyamkondan S., Jayas D.S., Holley R.A.

Pulsed electric field processing of foods: A review

Journal of Food Protection, 62 (1999), pp. 1088-1096

Jin J., Xu Z., Wei Z., Liu J.

Ultrasonic and microwave assisted extraction of rapeseed protein

Modern Food Science and Technology, 25 (2009), pp. 275-278, 265 ref.12

Kumari B., Tiwari B.K., Hossain M.B., Brunton N.P., Rai D.K.

Recent advances on application of ultrasound and pulsed electric field technologies in the extraction of bioactives from agro-industrial by-products

Food and Bioprocess Technology, 11 (2018), pp. 223-241

Liu J.-J., Gasmalla M.A.A., Li P., Yang R.

Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application

Innovative Food Science & Emerging Technologies, 35 (2016), pp. 184-193

Liu R.L., Yu P., Ge X.L., Bai X.F., Li X.Q., Fu Q.

Establishment of an aqueous PEG 200-based deep eutectic solvent extraction and enrichment method for pumpkin (*Cucurbita moschata*) seed protein

Food Analytical Methods, 6 (2016), pp. 1669-1680

Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S.

Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research

Pharmacognosy Reviews, 1 (2007), pp. 7-18

Moure A., Sineiro J., Domínguez H., Parajó J.C.

Functionality of oilseed protein products: A review

Food Research International, 39 (2006), pp. 945-963

Niu Y.X., Li W., Zhu J., Huang Q., Jiang M., Huang F.

Aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein from dehulled cold-pressed double-low rapeseed cake

International Journal of Food Engineering, 8 (2012), pp. 1-14

Ochoa-Rivas A., Nava-Valdez Y., Serna-Saldívar S.O., Chuck-Hernández C.

Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates

Food and Bioprocess Technology, 10 (2017), pp. 543-555

Oreopoulou V., Tzia C.

Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants

Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, Springer, New York (2007), pp. 209-232

Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Lebovka N., Vorobiev E.

Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels

Food Research International, 65 (2014), pp. 337-343

Phongthai S., Lim S.T., Rawdkuen S.

Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties

Journal of Cereal Science, 70 (2016), pp. 146-154

Picó Y.

Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples

TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 43 (2013), pp. 84-99

Pojić M., Mišan A., Tiwari B.

Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin

Trends in Food Science and Technology, 75 (2018), pp. 93-104

Rommi K., Ercili-Cura D., Hakala T.K., Nordlund E., Poutanen K., Lantto R.

Impact of total solid content and extraction pH on enzyme-aided recovery of protein from defatted rapeseed (*Brassica rapa* L.) press cake and physicochemical properties of the protein fractions

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (2015), pp. 2997-3003

Rommi K., Hakala T.K., Holopainen U., Nordlund E., Poutanen K., Lantto R.

Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.) press cakes

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62 (2014), pp. 7989-7997

Sari Y.W., Bruins M.E., Sanders J.P.M.

Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals

Industrial Crops and Products, 43 (2013), pp. 78-83

Sarkis J.R., Boussetta N., Blouet C., Tessaro I.C., Marczak L.D.F., Vorobiev E.
Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake

Innovative Food Science & Emerging Technologies, 29 (2015), pp. 170-177

Sathe S.K., Deshpande S.S., Salunkhe D.K.

Dry beans of phaseolus. A review. Part 1. Chemical composition: Proteins

CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 20 (1984), pp. 1-46

Sikorski Z.

The role of proteins in food

Chemical and Functional Properties of Food Components, Third edition, CRC Press, Taylor & Francis Group (2007), pp. 129-175

Spar Eskilsson S., Bjorklund E.

Analytical-scale microwave-assisted extraction

Journal of Chromatography A, 902 (2000), pp. 227-250

Tang B., Zhang H., Row K.H.

Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples

Journal of Separation Science, 38 (2015), pp. 1053-1064

Von Der Haar D., Müller K., Bader-Mittermaier S., Eisner P.

Rapeseed proteins – production methods and possible application ranges

OCL-Oilseeds & fats, Crops and Lipids, 21 (2014), p. D104

Wanasundara J.P.D.

Proteins of Brassicaceae oilseeds and their potential as a plant protein source

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51 (2011), pp. 635-677

Xu L., Diosady L. L.

Proteins from Plant Materials

Extraction Optimization in Food Engineering, Marcel Dekker Inc., New York (2003), pp. 199-216

Yu X., Bals O., Grimi N., Vorobiev E.

A new way for the oil plant biomass valorization: Polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields

Industrial Crops and Products, 74 (2015), pp. 309-318

Zainal-Abidin M.H., Hayyan M., Hayyan A., Jayakumar N.S.

New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review

Analytica Chimica Acta, 979 (2017), pp. 1-23

Zhu K., Sun X., Zhou H.

Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles

Journal of Cereal Science, 50 (2009), pp. 266-271

Λιαδάκης Γ.

Αξιοποίηση παραπροϊόντων βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας

(Διδακτορική διατριβή)

Ανακτήθηκε από: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/11555#page/1/mode/1up>

Παράρτημα

Πίνακας Π.1. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της συμβατικής υδατικής εκχύλισης

Univariate Tests of Significance for AE (συμβατική)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4924,984	1	4924,984	438,5614	0,000031
pH	10,827	1	10,827	0,9641	0,381751
temp	1,401	1	1,401	0,1248	0,741763
w/v	2,019	1	2,019	0,1798	0,693375
Error	44,919	4	11,230		

Πίνακας Π.2. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Univariate Tests of Significance for AK (συμβατική)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4077,230	1	4077,230	993,2488	0,000006
pH	147,488	1	147,488	35,9293	0,003897
temp	81,638	1	81,638	19,8877	0,011164
w/v	3,105	1	3,105	0,7564	0,433539
Error	16,420	4	4,105		

Πίνακας Π.3. Αποτελέσματα ελέγχου Duncan για τον παράγοντα της θερμοκρασίας στην Α.Κ. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Duncan test; variable AK (συμβατική)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 4,1049, df = 4,0000				
Cell No.	temp	{1}	{2}	
1	1	19,381	25,770	
2	2	0,011323		

Οι τιμές της θερμοκρασίας 1 και 2 κατά τον έλεγχο Duncan αντιστοιχούν σε θερμοκρασίες 40 και 50 °C.

Πίνακας Π.4. Αποτελέσματα ελέγχου Duncan για τον παράγοντα του pH στην Α.Κ. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Duncan test; variable AK (συμβατική)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 4,1049, df = 4,0000				
Cell No.	temp	{1}	{2}	
1	1	19,381	25,770	
2	2	0,011323		

Οι τιμές του pH 1 και 2 κατά τον έλεγχο Duncan αντιστοιχούν σε τιμές pH 8 και 9.

Πίνακας Π.5. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Univariate Tests of Significance for OA (συμβατική) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	253,5200	1	253,5200	323,4405	0,000056
pH	15,7189	1	15,7189	20,0542	0,011005
temp	5,0812	1	5,0812	6,4826	0,063568
w/v	0,7203	1	0,7203	0,9190	0,392035
Error	3,1353	4	0,7838		

Πίνακας Π.6. Αποτελέσματα ελέγχου Duncan για τον παράγοντα του pH στην Ο.Α. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Duncan test; variable OA (συμβατική) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,78382, df = 4,0000				
Cell No.	pH	{1}	{2}	
1	1	4,2277	7,0311	
2	2	0,011165		

Οι τιμές του pH 1 και 2 κατά τον έλεγχο Duncan αντιστοιχούν σε τιμές pH 8 και 9.

Πίνακας Π.7. Αποτελέσματα ANOVA για την Π.Π. των ρ.ι. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (συμβατική) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	50347,50	1	50347,50	1694,724	0,000002
pH	141,96	1	141,96	4,778	0,094115
temp	68,29	1	68,29	2,299	0,204072
w/v	0,57	1	0,57	0,019	0,896571
Error	118,83	4	29,71		

Πίνακας Π.8. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της συμβατικής υδατικής εκχύλισης χρησιμοποιώντας απειλαιωμένη και μη απειλαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for AE (απειλαιωμένη)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2606,965	1	2606,965	180,6756	0,047275
pH	20,051	1	20,051	1,3896	0,447865
μέθοδος	0,037	1	0,037	0,0026	0,967657
Error	14,429	1	14,429		

Πίνακας Π.9. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση χρησιμοποιώντας απειλαιωμένη και μη απειλαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for AK (απειλαιωμένη)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2408,169	1	2408,169	8422,996	0,006936
pH	90,798	1	90,798	317,582	0,035686
μέθοδος	13,604	1	13,604	47,583	0,091651
Error	0,286	1	0,286		

Πίνακας Π.10. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση χρησιμοποιώντας απειλαιωμένη και μη απειλαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for OA (απειλαιωμένη)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	162,6900	1	162,6900	120,8427	0,057753
pH	12,9737	1	12,9737	9,6366	0,198395
μέθοδος	1,3971	1	1,3971	1,0378	0,494102
Error	1,3463	1	1,3463		

Πίνακας Π.11. Αποτελέσματα ANOVA για το Π.Π. των p.i. όταν έχει πραγματοποιηθεί συμβατική υδατική εκχύλιση χρησιμοποιώντας απειλαιωμένη και μη απειλαιωμένη εργαστηριακά πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (απειλαιωμένη)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	27495,73	1	27495,73	658,7177	0,024792
pH	54,71	1	54,71	1,3107	0,457065
μέθοδος	0,14	1	0,14	0,0034	0,962712
Error	41,74	1	41,74		

Πίνακας Π.12. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for AE (μικροκύματα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10761,26	1	10761,26	935,4673	0,000000
ισχύς	1,32	1	1,32	0,1146	0,741979
λόγος	4,62	1	4,62	0,4013	0,540646
χρόνος	152,63	3	50,88	4,4226	0,031767
Error	115,04	10	11,50		

Πίνακας Π.13. Αποτελέσματα ελέγχου Duncan για τον παράγοντα του χρόνου στην Α.Ε. της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα

Duncan test; variable AE (μικροκύματα)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 11,504, df = 10,000					
Cell No.	χρόνος	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1	22,019	25,112	25,965	30,641
2	2	0,226426		0,729655	0,051964
3	3	0,147188	0,729655		0,079916
4	4	0,007199	0,051964	0,079916	

Οι τιμές του χρόνου 1, 2, 3, 4 κατά τον έλεγχο Duncan αντιστοιχούν σε χρόνο 2, 5, 8, και 10 min.

Πίνακας Π.14. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for AK (μικροκύματα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4341,390	1	4341,390	102,8635	0,000001
ισχύς	2,532	1	2,532	0,0600	0,811449
λόγος	181,944	1	181,944	4,3109	0,064600
χρόνος	25,124	3	8,375	0,1984	0,895089
Error	422,054	10	42,205		

Πίνακας Π.15. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for OA (μικροκύματα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	285,1260	1	285,1260	115,2224	0,000001
ισχύς	0,0717	1	0,0717	0,0290	0,868204
λόγος	8,2873	1	8,2873	3,3490	0,097171
χρόνος	5,6636	3	1,8879	0,7629	0,540235
Error	24,7457	10	2,4746		

Πίνακας Π.16. Αποτελέσματα ANOVA για το Π.Π. των ρ.ι. όταν έχει πραγματοποιηθεί υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (μικροκύματα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	81696,57	1	81696,57	888,4484	0,000000
ισχύς	60,42	1	60,42	0,6570	0,436476
λόγος	40,89	1	40,89	0,4447	0,519962
χρόνος	295,51	3	98,50	1,0712	0,404558
Error	919,54	10	91,95		

Πίνακας Π.17. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της υδατικής συμβατικής εκχύλισης και της υδατικής εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for AE (Συμβ vs MW)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3395,393	1	3395,393	1108,700	0,019114
λόγος	36,724	1	36,724	11,991	0,178973
μέθοδος	9,364	1	9,364	3,058	0,330723
Error	3,062	1	3,062		

Πίνακας Π.18. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for AK (Συμβ vs MW) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2377,538	1	2377,538	105668,3	0,001958
λόγος	15,288	1	15,288	679,5	0,024411
μέθοδος	106,090	1	106,090	4715,1	0,009271
Error	0,022	1	0,022		

Πίνακας Π.19. Αποτελέσματα ελέγχου Duncan για τον παράγοντα της μεθόδου στην Α.Κ. όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Duncan test; variable AK (Συμβ vs MW) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,02250, df = 1,0000				
Cell No.	μέθοδος	{1}	{2}	
1	1	29,530	19,230	
2	2	0,009602		

Οι τιμές της μεθόδου 1 και 2 κατά τον έλεγχο Duncan αντιστοιχούν στη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Πίνακας Π.20. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for OA (Συμβ vs MW) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	200,7889	1	200,7889	4148,531	0,009883
λόγος	6,4009	1	6,4009	132,250	0,055219
μέθοδος	4,9284	1	4,9284	101,826	0,062883
Error	0,0484	1	0,0484		

Πίνακας Π.21. Αποτελέσματα ANOVA για το Π.Π. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική υδατική εκχύλιση και υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (Συμβ vs MW) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	25818,06	1	25818,06	493,9091	0,028626
λόγος	32,95	1	32,95	0,6303	0,572816
μέθοδος	23,33	1	23,33	0,4463	0,625057
Error	52,27	1	52,27		

Πίνακας Π.22. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Effect	Univariate Tests of Significance for AE (θερμικά προκι Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3637,417	1	3637,417	365,5144	0,033268
είδος πρώτης ύλης	16,172	1	16,172	1,6251	0,423465
μέθοδος	2,722	1	2,722	0,2735	0,693220
Error	9,952	1	9,952		

Πίνακας Π.23. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Effect	Univariate Tests of Significance for AK (θερμικά προκι Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3297,906	1	3297,906	454,3038	0,029846
είδος πρώτης ύλης	22,564	1	22,564	3,1084	0,328464
μέθοδος	55,555	1	55,555	7,6529	0,220822
Error	7,259	1	7,259		

Πίνακας Π.24. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. της διεργασίας όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Effect	Univariate Tests of Significance for OA (θερμικά προκι Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	293,0259	1	293,0259	31995,00	0,003559
είδος πρώτης ύλης	0,1743	1	0,1743	19,03	0,143449
μέθοδος	3,6214	1	3,6214	395,42	0,031988
Error	0,0092	1	0,0092		

Πίνακας Π.25. Αποτελέσματα ANOVA για το Π.Π. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (θερμικά προκ)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	24497,54	1	24497,54	12255,94	0,005750
είδος πρώτης ύλης	2,27	1	2,27	1,13	0,480009
μέθοδος	114,66	1	114,66	57,36	0,083571
Error	2,00	1	2,00		

Πίνακας Π.26. Αποτελέσματα ANOVA για την Ι.Α.Ν. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for ΙΑΝ (θερμικά προκ)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1095162	1	1095162	822,0396	0,022195
είδος πρώτης ύλης	23562	1	23562	17,6861	0,148619
μέθοδος	4032	1	4032	3,0266	0,332116
Error	1332	1	1332		

Πίνακας Π.27. Αποτελέσματα ANOVA για την Ι.Α.Ε. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χρησιμοποιώντας θερμικά προκατεργασμένη και μη θερμικά προκατεργασμένη πρώτη ύλη

Univariate Tests of Significance for ΙΑΕ (θερμικά προκ)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2912142	1	2912142	2594,914	0,012496
είδος πρώτης ύλης	86142	1	86142	76,759	0,072350
μέθοδος	27722	1	27722	24,702	0,126401
Error	1122	1	1122		

Πίνακας Π.28. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Ε. της συμβατικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for AE (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7700,727	1	7700,727	389,6888	0,002556
είδος ενζύμου	40,418	2	20,209	1,0227	0,494400
μέθοδος	5,947	1	5,947	0,3009	0,638352
Error	39,522	2	19,761		

Πίνακας Π.29. Αποτελέσματα ANOVA για την Α.Κ. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for AK (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2046,188	1	2046,188	77,02739	0,012735
είδος ενζύμου	194,995	2	97,498	3,67024	0,214122
μέθοδος	4,649	1	4,649	0,17499	0,716353
Error	53,129	2	26,564		

Πίνακας Π.30. Αποτελέσματα ANOVA για την Ο.Α. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for OA (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	246,8466	1	246,8466	275,8297	0,003606
είδος ενζύμου	12,7339	2	6,3670	7,1145	0,123236
μέθοδος	0,4607	1	0,4607	0,5148	0,547553
Error	1,7898	2	0,8949		

Πίνακας Π.31. Αποτελέσματα ANOVA για το Π.Π. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for ΠΠ (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	29593,11	1	29593,11	312,2093	0,003188
είδος ενζύμου	160,00	2	80,00	0,8440	0,542303
μέθοδος	34,56	1	34,56	0,3646	0,607335
Error	189,57	2	94,79		

Πίνακας Π.32. Αποτελέσματα ANOVA για την Ι.Α.Ν. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for IAN (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1807308	1	1807308	235,0766	0,004227
είδος ενζύμου	31416	2	15708	2,0432	0,328606
μέθοδος	4988	1	4988	0,6488	0,505082
Error	15376	2	7688		

Πίνακας Π.33. Αποτελέσματα ANOVA για την Ι.Α.Ε. των p.i. όταν πραγματοποιείται συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση ή μη ενζυμικά προκατεργασμένης πρώτης ύλης

Univariate Tests of Significance for IAE (ένζυμα)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4704661	1	4704661	322,2776	0,003089
είδος ενζύμου	118623	2	59312	4,0629	0,197514
μέθοδος	4648	1	4648	0,3184	0,629407
Error	29196	2	14598		