ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Μελέτη καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης για την απομόνωση πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας από παραπροϊόντα σύνθλιψης ελαιούχων σπόρων

Γεωργακόπουλος Νικόλαος

Επίβλεψη: Κροκίδα Μαγδαληνή, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, 2025

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Σκοπός της εν λόγω εργασίας είναι η απομόνωση πρωτεϊνών από παραπροϊόντα της βιομηχανίας βρώσιμων ελαίων μέσω οικονομικά σύμφορων και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών εκχύλισης και ανάλυση της σύνθεσης αμινοξέων των πρωτεϊνών στα σημεία βέλτιστης ανάκτησης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια του Ε.Μ.Π Κροκίδα Μαγδαληνή, επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της Μηχανικής Φυσικών Διεργασιών και ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η εμπιστοσύνη την οποία επέδειξε προς το πρόσωπό μου και η καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας αποτέλεσαν για μένα πηγή έμπνευσης και ισχυρό κίνητρο για την εκπλήρωση της παρούσας εργασίας.

Η παρούσα Διπλωματική δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια και στήριξη του υποψήφιου διδάκτορα του ΕΜΠ Χριστόφορου Βασιλείου και της Δρ. Χριστίνας Δρόσου τους οποίους και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Η υπομονή τους κατά τη διάρκεια της εξοικείωσής μου με τις πειραματικές τεχνικές, το σύνολο των γνώσεων που μου μετέδωσαν, η άμεση ανταπόκριση στις απορίες μου και το ειλικρινές ενδιαφέρον τους για την πρόοδό μου συντέλεσαν καταλυτικά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών. Το κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την στήριξή τους τόσο κατά την εκπόνηση της εργασίας όσο και στα υπόλοιπα φοιτητικά χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σημερινή εποχή υπάρχει μεγάλη ανάγκη για εκμετάλλευση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης, καθώς η παγκόσμια ζήτηση δεν μπορεί να καλυφθεί από τις παραδοσιακές ζωικές πηγές. Η βιομηχανία κρέατος, ακόμη, ακολουθείται από σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως υψηλό αποτύπωμα άνθρακα και απώλεια βιοποικιλότητας. Παράλληλα, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων πηγών ζωικής πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Έτσι, οι φυτικές πρωτεΐνες έχουν εγείρει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως μια βιώσιμη και εναλλακτική λύση έναντι των ζωικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας ελαιούχων σπόρων, αφού διαθέτουν σημαντική ποσότητα φυτικής πρωτεΐνης υψηλής διατροφικής αξίας, η οποία συνήθως παραμένει ανεκμετάλλευτη. Η ανάκτηση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να αξιοποιηθεί από την βιομηχανία τροφίμων στην δημιουργία προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας. Επίσης, η αξιοποίηση τους συμβάλλει στην βιώσιμη ανάπτυξη, καθώς περιέχει την χρησιμοποίηση παραπροϊόντων υποστηρίζοντας την κυκλική οικονομία.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα μέσω καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης, η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων κάθε μεθόδου στην απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών και η αξιολόγηση των τελικών πρωτεϊνικών σκονών ως προς το χρώμα και την διαλυτότητα συναρτήσει του pH. Στο πλαίσιο της εργασίας, επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, οι οποίες αντιπροσωπεύουν συμβατικές και σύγχρονες τεχνολογίες εκχύλισης, προκειμένου να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητά τους στην ανάκτηση πρωτεϊνών από βαμβακόπιτα και να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες εφαρμογής τους. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν τρεις μέθοδοι εκχύλισης: η συμβατική εκχύλιση (Conventional Extraction - CE), η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction - PLE) και η εκχύλιση με συνδυασμό μικροκυμάτων και υπερήχων (Microwave and Ultrasound Assisted Extraction - MUAE). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 8 και 11), με χρήση διαλύματος NaOH, ενώ ακολούθησε όξινη καταβύθιση στο ισοηλεκτρικό σημείο (pH 4,05) με διάλυμα HCl, οδηγώντας στην καθίζηση των πρωτεϊνών, οι οποίες συλλέχθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν. Αρχικά προσδιορίστηκαν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε πρωτεΐνη και το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, για κάθε μέθοδο εκχύλισης εξετάστηκε η επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων στην αποδοτικότητα της διαδικασίας, με στόχο τη βελτιστοποίηση της ανάκτησης των πρωτεϊνών. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της απόδοσης της εκχύλισης ήταν: το ποσοστό καθίζησης (PY), η ανάκτηση πρωτεΐνης στο υγρό εκχύλισμα (PR_E) και η ανάκτηση πρωτεΐνης στη μάζα της καθίζησης (PR_P). Στη CE εφαρμόστηκε πλήρης παραγοντικός σχεδιασμό για την αξιολόγηση της επίδρασης της αναλογίας στερεού:υγρού (0,03–0,10 g/mL) και του χρόνου εκχύλισης (30–120 min). Στην PLE χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός Box–Behnken για τη βελτιστοποίηση τριών παραμέτρων: της αναλογίας στερεού:υγρού (0,03–0,10 g/mL), της θερμοκρασίας εκχύλισης (50–150 °C) και του χρόνου (3–10 min). Αντίστοιχα, για τη MUAE αξιολογήθηκε η επίδραση της ισχύος μικροκυμάτων (0–500 W), της ισχύος υπερήχων (0–700 W) και της αναλογίας στερεού:υγρού (0,03–0,10 g/mL), με χρήση του ίδιου πειραματικού σχεδιασμού. Σε όλες τις μεθόδους, στόχος ήταν η βελτιστοποίηση της διαδικασίας ως προς τις παραμέτρους του ποσοστού καθίζησης (PY), της ανάκτησης πρωτεΐνης στο εκχύλισμα (PR_E) και της ανάκτησης πρωτεΐνης στη μάζα καθίζησης (PR_P),

ενώ προσδιορίστηκε και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υγρό εκχύλισμα (PC_E) και στη μάζα καθίζησης (PC_P). Επιπλέον, εφαρμόστηκε ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης υπό τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν για την μέθοδο εκχύλισης που παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, τόσο στα υγρά εκχυλίσματα όσο και στη μάζα καθίζησης, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry, ενώ το προφίλ των αμινοξέων των εκχυλισμένων πρωτεϊνών στις βέλτιστες συνθήκες κάθε μεθόδου αναλύθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Επιπρόσθετα, ανακτηθείσες πρωτεΐνες αξιολογήθηκαν ως προς το χρώμα και τη διαλυτότητά τους σε εύρος pH 4–10, με σκοπό την προκαταρκτική εκτίμηση της λειτουργικής τους αξίας.

Ξεκινώντας από τη CE, παρατηρήθηκε ότι ευνοείται σε μεσαίες αναλογίες και μεγάλους χρόνους εκχύλισης και έδωσε ως αποτελέσματα PY, PR_P και PR_E τις τιμές 11,0%, 41,1% και 49,1%, αντίστοιχα, στις εξής βέλτιστες συνθήκες: αναλογία στερεού/υγρού 0,04 w/v, pH 11 και χρόνο εκχύλισης 120 λεπτά. Όσον αφορά την PLE, εξάχθηκε ως συμπέρασμα ότι ενισχύεται σε μικρές αναλογίες, υψηλές θερμοκρασίες και μεσαίους χρόνους εκχύλισης και οι τιμές των PY, PR_P και PR_E ήταν 18,7%, 74,8% και 85,5%, αντίστοιχα, στις βέλτιστες συνθήκες (αναλογία στερεού/υγρού 0,03 w/v, pH 11, θερμοκρασία 150°C και χρόνο εκχύλισης 6 λεπτά). Τέλος, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους διαπιστώθηκε ότι προάγεται σε μεσαίες αναλογίες και μεσαία ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων. Συγκεκριμένα παρουσίασε τιμές 15,7%, 38,0% και 46,4% για PY, PR_P και PR_E, αντίστοιχα, σε αναλογία στερεού/υγρού 0,04 w/v, pH 11, χρόνο εκχύλισης 10 λεπτά και ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων 200 και 450 W αντίστοιχα, οι οποίες ήταν και οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης. Μεταξύ των τριών μεθόδων, η PLE παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα και στις τρεις μεταβλητές PY, PR_P και PR_E στον μικρότερο χρόνο και αποτελεί την καλύτερη μέθοδο εκχύλισης πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα. Συνεπώς, η ενζυμική προκατεργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ακολουθήσει PLE. Η προσθήκη αυτής της διεργασίας στον πειραματικό σχεδιασμό ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αυξάνοντας τις παραμέτρους PY, PC_E και PR_E.

Το προφίλ αμινοξέων που προέκυψε επιβεβαιώνει τη συνέπεια της θρεπτικής αξίας των απομονωμένων πρωτεϊνών της βαμβακόπιτας με αυτή που έχει βρεθεί σε προηγούμενες έρευνες. Τα αμινοξέα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκαν είναι το ασπαρτικό οξύ (11,52%), το γλουταμικό οξύ (18,65%) και η αργινίνη (8,81%), ενώ με την μικρότερη η μεθειονίνη (1,34%) και η ιστιδίνη (2,10%). Το γεγονός αυτό ενισχύει τη δυνατότητα αξιοποίησης της βαμβακόπιτας ως εναλλακτικής πηγής φυτικών πρωτεϊνών με υψηλή διατροφική ποιότητα.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό του χρώματος, οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν σε pH 8 παρουσίασαν υψηλότερες τιμές φωτεινότητας σε σύγκριση με εκείνες που απομονώθηκαν σε pH 11. Μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης, οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν με τη μέθοδο MUAE εμφάνισαν τη μεγαλύτερη φωτεινότητα συγκριτικά με τις μεθόδους CE και PLE. Οι καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης, επίσης, φαίνεται να συμβάλλουν ουσιαστικά στην βελτίωση της διαλυτότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που εκχυλίστηκαν μέσω MUAE διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν μεγαλύτερη διαλυτότητα από την CE, ενώ αυτές μέσω PLE παρουσίασαν μεγαλύτερη διαλυτότητα από εκείνες με MUAE στις τιμές pH 4-10. Τελικά, η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, κατά

την οποία προηγήθηκε και κατεργασία με ένζυμο, φάνηκε ότι είχε την μεγαλύτερη θετική επίδραση στην διαλυτότητα.

Τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώνουν μόνο την αποδοτικότητα των συγκεκριμένων μεθόδων, αλλά αναδεικνύουν και τη δυναμική τους ως πολλά υποσχόμενες τεχνολογικές προσεγγίσεις. Η εφαρμογή τους θα μπορούσε να διευρύνει τις δυνατότητες αξιοποίησης της βαμβακόπιτας σε νέα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, σε ενισχυμένες ζωοτροφές με υψηλότερη θρεπτική αξία, καθώς και σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπου απαιτούνται πρωτεΐνες με εξειδικευμένες λειτουργικές ιδιότητες. Επιπλέον, η συμβολή αυτών των μεθόδων στην αποτελεσματικότερη αξιοποίηση ενός αγροβιομηχανικού παραπροϊόντος ενισχύει την προοπτική τους στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας και της βιώσιμης παραγωγής.

Λέξεις Κλειδιά

βαμβακόσπορος, εκχύλιση, πίεση, μικροκύματα, υπέρηχοι, ένζυμα, σύνθεση αμινοξέων, χρωματομετρία, διαλυτότητα

ABSTRACT

Nowadays, there is a great need to exploit alternative sources of protein, as global demand cannot be met by traditional animal sources. The meat industry is also followed by serious environmental impacts, such as a high carbon footprint and biodiversity loss. At the same time, the consumption of large quantities of animal protein sources has been associated with negative consequences on human health. Thus, plant proteins have attracted great interest in recent years as a sustainable and alternative solution to animal proteins. A typical example is the by-products of the oilseed industry, since they have a significant amount of plant protein of high nutritional value, which usually remains unexploited. The recovery of these proteins can be exploited by the food industry in the creation of products of high nutritional value. Also, their exploitation contributes to sustainable development, as it involves the use of by-products, supporting the circular economy.

The aim of this thesis was to isolate proteins from cottonseed cake using innovative extraction methods, to study the effect of each method's parameters on protein recovery efficiency and to evaluate the recovered protein fractions in terms of colour and solubility as a function of pH. In the context of the work, three different extraction techniques were selected, representing conventional and modern extraction technologies, in order to investigate their effectiveness in recovering proteins from cottonseed cake and to identify their optimal application conditions. Specifically, three extraction methods were applied: conventional extraction (CE), pressurized liquid extraction (PLE) and microwave and ultrasound assisted extraction (MUAE). The extraction was performed in an alkaline environment (pH 8 and 11), using a NaOH solution, followed by acidic precipitation at the isoelectric point (pH 4.05) with HCl solution, leading to the precipitation of the proteins, which were collected and lyophilized. Initially, the protein content of the raw material and the isoelectric point of the proteins were determined. Then, for each extraction method, the effect of the operating parameters on the efficiency of the process was examined, with the aim of optimizing the recovery of proteins. The parameters used to evaluate the extraction efficiency were: the precipitation percentage (PY), the protein recovery in the liquid extract (PR_E) and the protein recovery in the precipitate mass (PR_P). In CE, a full factorial design was applied to evaluate the effect of solid:liquid ratio (0.03–0.10 g/mL) and extraction time (30–120 min). In PLE, a Box–Behnken design was used to optimize three parameters: solid:liquid ratio (0.03–0.10 g/mL), extraction temperature (50–150 °C), and time (3–10 min). Similarly, for MUAE, the effect of microwave power (0–500 W), ultrasound power (0–700 W), and solid:liquid ratio (0.03–0.10 g/mL) was evaluated using the same experimental design. In all methods, the goal was to optimize the process in terms of the parameters of precipitation percentage (PY), protein recovery in the extract (PR_E) and protein recovery in the precipitate (PR_P), while the protein concentration in the liquid extract (PCE) and in the precipitate (PCP) was also determined. In addition, enzymatic pretreatment of the raw material was applied under the optimal conditions that resulted for the extraction method that presented the best results. The protein content, both in the liquid extracts and in the precipitate, was determined by the Lowry method, while the amino acid profile of the extracted proteins under the optimal conditions of each method was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition, recovered

proteins were evaluated in terms of their color and solubility in the pH range 4–10, with the aim of preliminary assessment of their functional value.

Starting from CE, it was observed that it is favored at medium ratios and long extraction times and gave PY, PR_P and PR_E results of 11.0%, 41.1% and 49.1%, respectively, at the following optimal conditions: solid/liquid ratio 0.04 w/v, pH 11 and extraction time 120 minutes. Regarding PLE, it was concluded that it is enhanced at small ratios, high temperatures and medium extraction times and the values of PY, PR_P and PR_E were 18.7%, 74.8% and 85.5%, respectively, at the optimal conditions (solid/liquid ratio 0.03 w/v, pH 11, temperature 150oC and extraction time 6 minutes). Finally, microwave and ultrasound-assisted extraction was found to be promoted at medium ratios and medium microwave and ultrasound power. Specifically presented values of 15.7%, 38.0% and 46.4% for PY, PR_P and PR_E, respectively, at a solid/liquid ratio of 0.04 w/v, pH 11, extraction time of 10 min and microwave and ultrasound power of 200 and 450 W respectively, which were the optimal extraction conditions. Among the three methods, PLE presented the best results in all three variables PY, PRP and PRE in the shortest time and is the best method for extracting proteins from cottonseed cake. Therefore, enzymatic pretreatment was performed before PLE. The addition of this process to the experimental design enhanced the extraction efficiency by increasing the PY, PC_E and PR_E parameters.

The resulting amino acid profile confirms the consistency of the nutritional value of the isolated proteins of cottonseed with that found in previous studies. The amino acids with the highest concentration detected are aspartic acid (11.52%), glutamic acid (18.65%) and arginine (8.81%), while the lowest are methionine (1.34%) and histidine (2.1%). In addition, 8 essential amino acids for the human body were identified at a rate of 41.7%, higher than the 29% recommended by the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization (2007). This fact strengthens the possibility of utilizing cottonseed as an alternative source of vegetable proteins with high nutritional quality.

Regarding color characterization, the proteins isolated at pH 8 exhibited higher lightness values compared to those isolated at pH 11. Among the extraction methods, the proteins obtained through MUAE showed the highest lightness in comparison to CE and PLE. Innovative extraction methods also seem to contribute substantially to improving the solubility of isolated proteins. Proteins extracted by MUAE were found to have higher solubility than CE, while those extracted by PLE showed higher solubility than those extracted by MUAE at pH values of 4-10. Ultimately, pressurized liquid extraction, which was preceded by enzyme treatment, appeared to have the greatest positive effect on solubility.

These findings not only confirm the efficiency of these methods, but also highlight their potential as promising technological approaches. Their application could expand the possibilities of utilizing cottonseed cake in new plant-based foods, in fortified animal feeds with higher nutritional value, as well as in biotechnological applications where proteins with specialized functional properties are required. Furthermore, the contribution of these methods to the more effective utilization of an agro-industrial by-product strengthens their perspective in the context of the circular economy and sustainable production.

Key Words

cottonseed, extraction, pressure, microwave, ultrasound, enzymes, aminoacid profile, colorimetry, solubility

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ..... **i**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **ii**

ABSTRACT ..... **v**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **viii**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ..... **xiii**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ ..... **xv**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ..... **xvii**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **19**

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι **19**

1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση **19**

1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά **19**

1.4 Διάρθρωση **20**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **21**

2.1 Πρωτεΐνες **21**

2.1.1 Λειτουργίες πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό 22

2.1.2 Ζωική πρωτεΐνη 23

2.1.3 Διατροφική αξία φυτικών πρωτεϊνών 25

2.1.3.1 Σύνθεση αμινοξέων 25

2.1.3.2 Πεπτικότητα 27

2.2 Η βιομηχανία ελαιούχων σπόρων **29**

2.2.1 Μέθοδοι ανάκτησης ελαίων 30

2.2.2 Εφαρμογές ελαίων 32

2.2.3 Εφαρμογές πρωτεϊνών ελαιούχων σπόρων 33

2.2.4 Άλευρα παραπροϊόντων ελαιούχων σπόρων 34

2.2.4.1 Εφαρμογές αλεύρων ελαιούχων σπόρων στην βιομηχανία τροφίμων 35

2.2.5 Το βαμβάκι ως ελαιούχος σπόρος 38

2.2.5.1 Παραπροϊόντα σύνθλιψης βαμβακόσπορου 39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Τεχνολογίες εκχύλισης 40

3.1 Συμβατική εκχύλιση 41

3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους 41

3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα 43

3.4 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση 44

3.5 Ενζυμική εκχύλιση 44

3.6 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικές πηγές 46

3.6.1 Χημικές μέθοδοι 46

3.6.2 Ενζυμική εκχύλιση 48

3.6.3 Φυσικές μέθοδοι 49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Χαρακτηρισμός Πρωτεϊνών 53

4.1 Ανάλυση αμινοξέων 53

4.2 Ιδιότητες πρωτεϊνών 53

4.2.1 Χρωματομετρία 54

4.2.2 Διαλυτότητα 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 55

5.1 Πειραματικός Σχεδιασμός 55

5.1.1 Ανάκτηση πρωτεϊνών 55

5.2 Υλικά 56

5.2.1 Πρώτες Ύλες 56

5.2.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια 56

5.3 Μεθοδολογία 57

5.4 Ανάκτηση πρωτεϊνών 59

5.4.1 Συμβατική εκχύλιση 59

5.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και υπερήχους 60

5.4.3 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση 61

5.4.4 Ενζυμική προκατεργασία 62

5.5 Ισοηλεκτρικό σημείο 63

5.6 Μέτρηση χαρακτηριστικών πρώτης ύλης, εκχυλισμάτων και τελικών προϊόντων ... 63

5.7 Ανάλυση σύνθεσης αμινοξέων 65

5.8 Χρωματομετρία 65

5.9 Διαλυτότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών 65

5.10 Στατιστική ανάλυση 66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 66

6.1 Πρωτεϊνικό περιεχόμενο πρώτης ύλης 66

6.2 Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου 66

6.3 Εκχυλίσεις σε pH 8 67

6.3.1 Συμβατική εκχύλιση 67

6.3.2 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση 68

6.3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους 68

6.3.4 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε pH 8 70

6.4 Εκχυλίσεις σε pH 11 71

6.4.1 Συμβατική εκχύλιση 71

6.4.2 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση 73

6.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους 77

6.4.4 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε pH 11 82

6.4.5 Ενζυμική προκατεργασία 83

6.5 Σύνθεση αμινοξέων απομονωμένων πρωτεϊνών στις βέλτιστες συνθήκες 84

6.6 Χρωματομετρία 86

6.7 Διαλυτότητα 87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ 88

7.1 Σημαντικές Παρατηρήσεις - Συμπεράσματα 88

7.2 Προοπτικές για το μέλλον 90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 93

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 6.2 Βέλτιστες τιμές ΡΥ για κάθε μέθοδο εκχύλισης σε pH 8. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα. 70

Διάγραμμα 6.3 Βέλτιστες τιμές PC_E για κάθε μέθοδο εκχύλισης σε pH 8. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα. 71

Διάγραμμα 6.4 ΡΥ (α), PR_E (β) και PR_P (γ) συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και χρόνου εκχύλισης για την CE σε pH 11 73

Διάγραμμα 6.5 (α) ΡΥ συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας, (β) ΡΥ συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας και (γ) ΡΥ συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας για την PLE σε pH 11 75

Διάγραμμα 6.6 (α) PR_P συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας και (β) PR_P συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την PLE σε pH 11 76

Διάγραμμα 6.7 (α) PR_E συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας και (β) PR_E συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την PLE σε pH 11 77

Διάγραμμα 6.8 Επίδραση του χρόνου στις τιμές των ΡΥ (α), PR_P (β) και PR_E (γ) για την MUAE σε pH 11. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα. 78

Διάγραμμα 6.9 (α) ΡΥ συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος υπερήχων και (β) ΡΥ συναρτήσει ισχύος υπερήχων και μικροκυμάτων για την MUAE σε pH 11 80

Διάγραμμα 6.10 (α) PR_E συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος μικροκυμάτων και (β) PR_E συναρτήσει αναλογίας και ισχύος υπερήχων για την MUAE σε pH 11 80

Διάγραμμα 6.11 (α) PR_P συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος μικροκυμάτων και (β) PR_P συναρτήσει ισχύος υπερήχων και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την MUAE σε pH 11 81

Διάγραμμα 6.12 Σύγκριση ΡΥ (α), PR_E (β) και PR_P (γ) βέλτιστων συνθηκών μεταξύ των μεθόδων σε pH 11. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα. 82

Διάγραμμα 6.13 Διαλυτότητα πρωτεϊνών κάθε μεθόδου εκχύλισης σε διάφορα pH 87

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1 Συμβατικές εκχυλίσεις ορισμένων σπόρων (Kumar et al., 2021) 48

Πίνακας 3.2 Φυσικές τεχνικές εκχύλισης σπόρων (Kumar et al., 2021) 50

Πίνακας 5.1 Μεταβλητές παράμετροι συμβατικών εκχυλίσεων 59

Πίνακας 5.2 Ανεξάρτητες μεταβλητές εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από μικροκύματα και υπερήχους..... 60

Πίνακας 5.3 Παράμετροι εκχυλίσεων υγρού υπό πίεση 61

Πίνακας 6.1 Περιεχόμενη πρωτεΐνη στην βαμβακόπιτα 66

Πίνακας 6.2 Επίδραση pH στην καταβυθιζούμενη μάζα 66

Πίνακας 6.3 Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης σε pH 8 67

Πίνακας 6.4 Αποτελέσματα εκχύλισης με υγρό υπό πίεση σε pH 8 68

Πίνακας 6.5 Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα και υπερήχους σε pH 8 . 69

Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης σε pH 11 71

Πίνακας 6.7 Αποτελέσματα εκχύλισης υγρού υπό πίεση σε pH 11..... 73

Πίνακας 6.8 Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα και υπερήχους σε pH 11 79

Πίνακας 6.9 Αποτελέσματα κάθε μεθόδου εκχύλισης στις βέλτιστες συνθήκες 82

Πίνακας 6.10 Αποτελέσματα ενζυμικής προκατεργασίας..... 84

Πίνακας 6.11 Συγκέντρωση αμινοξέων (mg/g προϊόντος) σε κάθε μέθοδο εκχύλισης pH 11 85

Πίνακας 6.12 Τιμές χρώματος των δειγμάτων σε βέλτιστες συνθήκες 86

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 Δευτεροταγείς δομές α-έλικας και β-πτυχωτής επιφάνειας (blogs.sch.gr) 22

Εικόνα 2.2 Εκπομπή CO_2 και χρήσης γης ανά τρόφιμο (Li Day et al., 2021) 24

Εικόνα 2.3 Σύνθεση αμινοξέων διαφόρων πηγών πρωτεΐνης (Li Day et al., 2021)..... 27

Εικόνα 2.4 Πεπτικότητα ορισμένων πρωτεϊνικών πηγών (Li Day et al., 2021) 29

Εικόνα 2.5 Έλαια χρησιμοποιούμενα στην μαγειρική (uchealth.org) 32

Εικόνα 2.6 Διάθεση σογιέλαιου στις ΗΠΑ (eia.gov) 33

Εικόνα 2.7 Πίτες διαφόρων ελαιούχων σπόρων (Rani et al., 2021)..... 35

Εικόνα 2.8 Προϊόν «Incaparina» 40

Εικόνα 5.1 Βαμβακόπιτα έπειτα από άλεση..... 56

Εικόνα 5.2 Πειραματική διαδικασία εκχύλισης και παραλαβής του τελικού καταβυθιζούμενου στερεού 57

Εικόνα 5.3 Καταψύκτης Panasonic, MDF-U3386S, -80 °C..... 58

Εικόνα 5.4 Όργανο λυοφιλίωσης Leybold – Heraeus, GT 2A..... 58

Εικόνα 5.5 Συσκευή Multiparameter Bench Meter για μέτρηση του pH 59

Εικόνα 5.6 Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα και υπερήχους 61

Εικόνα 5.7 Διάταξη εκχύλισης υγρό υπό πίεση Pressurised Liquid Extraction 62

Εικόνα 5.8 Θερμοστατικό λουτρό για ενζυμική κατεργασία..... 62

Εικόνα 5.9 Σύστημα απόσταξης Kjeldahl K380..... 64

Εικόνα 5.10 Χρωματόμετρο MiniScan XE..... 65

Εικόνα 6.1 Χρωματογράφημα HPLC της σύνθεσης αμινοξέων των απομονωμένων πρωτεϊνών βαμβακόπιτας 85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι

Μεγάλη σημασία και επιστημονικό ενδιαφέρον έγκεινται στην αξιοποίηση παραπροϊόντων χαμηλής οικονομικής αξίας, προς την παραγωγή νέων προϊόντων και βιοδραστικών συστατικών, συμβάλλοντας έτσι στην κυκλική οικονομία. Επίσης, η αξιοποίηση αυτών των παραπροϊόντων μπορεί να δώσει λύση στην παγκόσμια επισιτιστική κρίση, η οποία δυσχεραίνεται με την αύξηση του πληθυσμού. Για τα παραπροϊόντα από ελαιούχους σπόρους, η ισχύουσα πρακτική προβλέπει στην αξιοποίηση αυτών ως ζωοτροφές. Οι φυτικές πρωτεΐνες υψηλής διατροφικής αξίας δύνανται να συμβάλλουν στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών. Τέλος, η πρακτική ανάκτησης παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς εξετάζεται η χρήση «πράσινων» μεθόδων εκχύλισης με την εφαρμογή μικροκυμάτων και υπερήχων, υψηλής πίεσης, καθώς και ενζύμων.

Πιο συγκεκριμένα, αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η αξιοποίηση παραπροϊόντων βιομηχανιών ελαιούχων σπόρων για την παραλαβή πρωτεϊνών μέσω εκχύλισης και, έπειτα, όξινης καταβύθισης, με χρήση φιλικών ως προς το περιβάλλον και οικονομικά ευνοϊκών μεθόδων και διεργασιών. Συγκεκριμένα στόχος είναι η μελέτη και αριστοποίηση της ανάκτησης πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα, προκειμένου να αξιοποιηθούν ως πρόσθετο τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψιν και τις λειτουργικές ιδιότητες που μελετώνται.

1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ολιστική και περιβαλλοντικά βιώσιμη εκμετάλλευση των παραπροϊόντων βιομηχανίας ελαιούχων σπόρων, για την ανάκτηση πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας, οι οποίες θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων.

Η μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν αποτέλεσμα ενδελεχούς βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης, με μικροκύματα και υπερήχους, με υπερυψυλή πίεση και με την βοήθεια ενζυμικής κατεργασίας και μελετήθηκαν οι βασικές παράμετροι με σκοπό την αριστοποίησή τους. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες μετρήσεις για τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων και των τελικών καταβυθιζούμενων μαζών. Τέλος, στα σημεία βέλτιστης ανάκτησης πρωτεϊνών αναλύθηκε η σύνθεση των αμινοξέων και μελετήθηκε το χρώμα και η διαλυτότητα σε ορισμένες τιμές pH.

1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά

Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας εργασίας διαμορφώθηκαν ως εξής:

- Ανάκτηση πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας από τη βαμβακόπιτα, ένα παραπροϊόν της επεξεργασίας βαμβακόσπορου, με σκοπό την αξιοποίησή της ως εναλλακτικής και βιώσιμης πηγής φυτικών πρωτεϊνών.

- Διερεύνηση καινοτόμων τεχνολογιών εκχύλισης, με συστηματική μελέτη των ανεξάρτητων παραμέτρων, όπως pH, θερμοκρασία και αναλογία στερεού/υγρού, ώστε να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες που οδηγούν στη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των πρωτεϊνών.
- Ανάλυση της αμινοξικής σύστασης των απομονωμένων πρωτεϊνών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με στόχο την αξιολόγηση της διατροφικής τους ποιότητας και την ανάδειξη της πιθανής τους χρήσης σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής.
- Μελέτη φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπως το χρώμα και η διαλυτότητα σε συνάρτηση με το pH, υπό τις βέλτιστες συνθήκες κάθε μεθόδου εκχύλισης, ώστε να εκτιμηθεί η λειτουργικότητα και η τεχνολογική καταλληλότητα των πρωτεϊνικών κλασμάτων για πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές.

Δεδομένου ότι όλοι οι παραπάνω στόχοι ολοκληρώθηκαν επιτυχώς, η παρούσα εργασία συμβάλλει με σαφήνεια στην επιστημονική γνώση γύρω από την αξιοποίηση της βαμβακόπιτας, προσφέροντας τόσο καινοτόμες μεθοδολογικές προσεγγίσεις όσο και λεπτομερή αποτελέσματα που μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο οδηγό για μελλοντικές έρευνες στον τομέα της εκχύλισης και της εφαρμογής φυτικών πρωτεϊνών.

1.4 Διάρθρωση

Στο πρώτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται αρχικά το αντικείμενο και οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακολούθως, αναφέρεται η μεθοδολογική προσέγγιση που ακολουθήθηκε, οι επιμέρους στόχοι και η αναμενόμενη συνεισφορά της. Τέλος, παρουσιάζεται η διάρθρωσή της.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αρχικά, αναφορά στις πρωτεΐνες, τις λειτουργίες τους στον ανθρώπινο οργανισμό και τις διαφορές ζωικών και φυτικών. Στη συνέχεια δίνεται έμφαση στον κλάδο των βιομηχανιών βρώσιμων ελαίων, τα προϊόντα που παράγει, τις τεχνικές επεξεργασίας που ακολουθεί και το είδος και τη σύσταση των παραπροϊόντων που προκύπτουν από αυτές.

Έτσι, στο τρίτο κεφάλαιο, γίνεται αναφορά των μεθόδων εκχύλισης που μπορούν να εφαρμοστούν με σκοπό την παραλαβή πρωτεϊνών από φυτικές πηγές.

Στο τέταρτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται οι μέθοδοι χαρακτηρισμού των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και η ανάλυση της σύνθεσης των αμινοξέων.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία, που ακολουθήθηκε.

Στο έκτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται, αναλύονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων και συντελείται η εξαγωγή των συμπερασμάτων.

Τέλος, στο έβδομο κεφάλαιο προτείνονται μελλοντικές προοπτικές για την εξέλιξη του μελετώμενου θέματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

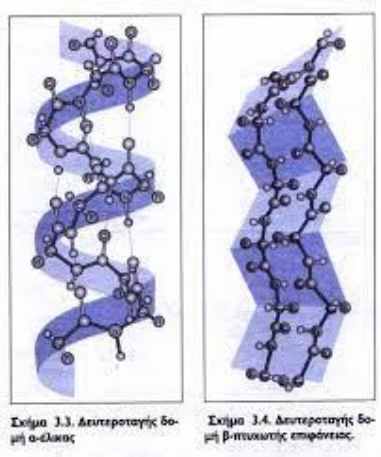
2.1 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες στη διατροφή του ανθρώπου διαφέρουν σε χημικές, βιολογικές, λειτουργικές και θρεπτικές ιδιότητες, ανάλογα με την πηγή τους, τη μοριακή τους σύνθεση και τη δομή τους. Η πρόσληψη πρωτεΐνης στη διατροφή μας προέρχεται από φυσικές τροφές (ωμές, μαγειρεμένες ή επεξεργασμένες) ή από διαμορφωμένα προϊόντα τροφίμων που περιέχουν κλασματοποιημένα συστατικά πρωτεΐνης που προέρχονται από ζωικές ή φυτικές πηγές. Η πρωτεΐνη είναι ένα μακροθρεπτικό συστατικό που αποτελείται από αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν μεγάλα, σύνθετα μόρια υπεύθυνα για πολυάριθμες σωματικές λειτουργίες. Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, τα οποία είναι τα μόνα μακροθρεπτικά συστατικά που περιέχουν άζωτο για το ανθρώπινο σώμα. Υπάρχουν 20 κοινά διατροφικά αμινοξέα. Αυτά τα αμινοξέα μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα. Τα μη απαραίτητα αμινοξέα συντίθενται εύκολα στο ανθρώπινο σώμα από άλλους προδρόμους και δεν απαιτούν διατροφική πρόσληψη για την κάλυψη των αναγκών του ανθρώπινου οργανισμού. Ορισμένα μη απαραίτητα αμινοξέα καθίστανται περιοριστικά υπό συγκεκριμένες ιατρικές καταστάσεις ή φυσιολογικό στρες λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητας προδρόμων. Αυτά τα αμινοξέα ονομάζονται «υπό όρους απαραίτητα αμινοξέα». Όσον αφορά τα απαραίτητα αμινοξέα, αυτά δε συντίθενται στο ανθρώπινο σώμα και χρειάζεται να λαμβάνονται μέσω διατροφικών πηγών για την πρόληψη της ανεπάρκειας. Αυτά τα απαραίτητα αμινοξέα είναι 9 και, συγκεκριμένα, η φαινυλαλανίνη, η βαλίνη, η τρυπτοφάνη, η θρεονίνη, η ισολευκίνη, η μεθειονίνη, η ιστιδίνη, η λευκίνη και η λυσίνη.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να οριστούν περαιτέρω από τα τέσσερα δομικά τους επίπεδα: πρωτοταγές, δευτεροταγές, τριτοταγές και τεταρτοταγές. Το πρώτο επίπεδο είναι η πρωτοταγής δομή και αποτελείται από τη γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων. Όλα τα αμινοξέα συνδέονται μέσω πεπτιδικών δεσμών. Αυτοί οι δεσμοί έχουν καθορισμένες θέσεις ατόμων άνθρακα άλφα, βήτα και γάμμα, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες θέσεις σε σχέση με τον πεπτιδικό δεσμό. Αυτή η δομή έχει επίσης το όνομα της πρωτεϊνικής ραχοκοκαλιάς (Belitz, 2009).

Το δεύτερο επίπεδο πρωτεϊνικής δομής είναι η δευτεροταγής δομή και αποτελείται από τα διάφορα σχήματα που διαμορφώνονται μέσω δεσμών υδρογόνου. Αυτά τα σχήματα περιλαμβάνουν την άλφα έλικα και το βήτα-πτυχωτό φύλλο. Βιολογικά, αυτό το επίπεδο μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε τρεις κοινές δομές. Η πρώτη είναι οι άλφα-έλικες οι οποίες αποτελούνται από αμινοξέα σε μια σπειροειδή διαμόρφωση, επιτρέποντας τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ αζώτου και υδρογόνου, συγκεκριμένα μεταξύ νιτρικών ομάδων ενός αμινοξέος με την καρβοξυλική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος τέσσερις υπομονάδες νωρίτερα. Ορισμένα αμινοξέα είναι πιο επιρρεπή στον σχηματισμό άλφα ελίκων, όπως η μεθειονίνη, η γλουταμίνη, η κυστεΐνη, η ιστιδίνη και η λυσίνη. Η δεύτερη είναι τα βήτα-πτυχωτά φύλλα. Τα βήτα-πτυχωτά φύλλα είναι αμινοξέα σε μια σειρά γειτονικών υπομονάδων, επιτρέποντας τον σχηματισμό πλευρικών δεσμών υδρογόνου λόγω της πολικότητας του πεπτιδικού δεσμού ενός αμινοξέος και της πολικότητας της καρβοξυλικής ομάδας ενός άλλου αμινοξέος. Ορισμένα αμινοξέα είναι πιο επιρρεπή στο σχηματισμό βήτα-πτυχωτών

φύλλων. Μερικά παραδείγματα είναι η ισολευκίνη, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη. Η τρίτη, τέλος, συνδυάζει άλφα-έλικες και βήτα-πτυχώσεις (Belitz, 2009).



Εικόνα 2.1 Δευτεροταγείς δομές α-έλικας και β-πτυχωτής επιφάνειας (blogs.sch.gr)

Το τρίτο επίπεδο πρωτεϊνικής δομής είναι η τριτοταγής δομή. Αποτελείται από το τρισδιάστατο σχήμα που σχηματίζεται όταν η ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αλληλεπιδρά με το υδατικό περιβάλλον του κυττάρου. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα απομονώνει λιποδιαλυτά υδρόφοβα μέρη και εκθέτει εκείνα που είναι υδρόφιλα για να επιτύχει θερμοδυναμική σταθερότητα. Αυτή η θερμοδυναμική σταθερότητα καθοδηγείται περαιτέρω από διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων Van der Waals και ιοντικών δεσμών (Belitz, 2009).

Το τέταρτο επίπεδο της πρωτεϊνικής δομής ονομάζεται τεταρτοταγής δομή. Αυτό το επίπεδο ανιχνεύεται όταν σχηματίζονται σύμπλοκα από πολλαπλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Ένα παράδειγμα είναι η αιμοσφαιρίνη και πώς σχηματίζεται η τετραμερής δομή της, όταν χημικές αλληλεπιδράσεις συγκρατούν 2 άλφα και 2 βήτα διαμορφώσεις μαζί. Επομένως, η τεταρτοταγής δομή είναι η τρισδιάστατη διάταξη δύο ή περισσότερων πολυπεπτιδίων σε μια πρωτεΐνη, το καθένα από τα οποία αναδιπλώνεται ανεξάρτητα (Belitz, 2009).

2.1.1 Λειτουργίες πρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό

Οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανθρώπινη βιοχημεία. Ο κύριος ρόλος τους είναι να παρέχουν τα δομικά στοιχεία του σώματος, ενώ είναι και οι πρόδρομοι αρκετών βιολογικά σημαντικών μορίων. Έτσι διαδραματίζουν πολλές διεργασίες στο ανθρώπινο σώμα.

Τα ένζυμα είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσης και επιταχύνουν μια αντίδραση ως καταλύτες. Οι καταλυόμενες αντιδράσεις πραγματοποιούνται 1 εκατομμύριο ή και περισσότερες φορές ταχύτερα, καθώς μέσω των ενζύμων ελαττώνεται η απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης και περισσότερα μόρια περνούν το ενεργειακό αυτό φράγμα στο ίδιο χρονικό διάστημα με τις μη καταλυόμενες αντιδράσεις. Τα ένζυμα μπορούν να καταλύσουν οδούς για την παραγωγή ή τη διάσπαση βιολογικών μορίων. Κάθε ένζυμο ρυθμίζεται από ανταγωνιστικούς και μη ανταγωνιστικούς αναστολείς ή από αλλοστερικά μόρια, παράγοντες που δρουν είτε ενισχυτικά είτε

αποτρεπτικά στην καταλυτική δράση. Η θέση σύνδεσης υποστρώματος είναι το ενεργό κέντρο. Ο τρόπος με τον οποίο το υπόστρωμα αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο υποδηλώνει τη συγγένεια αυτού του ενζύμου. Μεγαλύτερη συγγένεια σημαίνει ότι χρειάζονται λιγότερα υποστρώματα για να επιτευχθεί μια αντίδραση. Μια μετάλλαξη που αλλάζει την ενεργό θέση μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τη συγγένεια (Agarwal, 2006). Έτσι πρωτεΐνες με τον ρόλο των ενζύμων καταλύουν αντιδράσεις που παράγουν βιολογικά σημαντικά μόρια, απαραίτητα για την λειτουργία του οργανισμού, αλλά και πρωτεΐνες που μπορούν να δράσουν επικουρικά στις ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις, αποτυπώνοντας την αλληλένδετη και επαναλαμβανόμενη δράση των μορίων στον άνθρωπο.

Οι κινητήριες πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος σε ποικίλες διεργασίες. Μεταφέρουν μόρια μέσα στο κύτταρο, παρέχουν κίνηση ορισμένων τμημάτων μεμονωμένων κυττάρων που εμπλέκονται σε εξειδικευμένες λειτουργίες καθώς επίσης προκαλούν και κινήσεις υγρών και ημιστερεών, όπως η κυκλοφορία του αίματος και η μετακίνηση της τροφής μέσω του πεπτικού σωλήνα. Παράλληλα, συμβάλλουν και σε διεργασίες μεγαλύτερης κλίμακας. Μέσω των ρόλων τους στους σκελετικούς μύες επιτελούν την κίνηση του ανθρώπινου σώματος. Η μυοσίνη είναι μια πρωτεΐνη με υδρόφοβη ουρά, μια ομάδα κεφαλής που μπορεί να προσκολλάται και να αποκολλάται από νημάτια ακτίνης, και ένα τμήμα άρθρωσης, το οποίο μετακινεί την ομάδα κεφαλής μπρος-πίσω, με αποτέλεσμα την κίνηση (Schreiber, 2002).

Τα πρωτεϊνικά κανάλια είναι απαραίτητα για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών εντός και εκτός των κυττάρων, για νευρικά σήματα και για την επιλεκτική διήθηση των νεφρικών μορίων. Παράδειγμα αποτελεί η αντλία Na^+/K^+ η οποία είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των συγκεντρώσεων αυτών στα αντίστοιχα διαμερίσματά τους (Chavan et al., 2017).

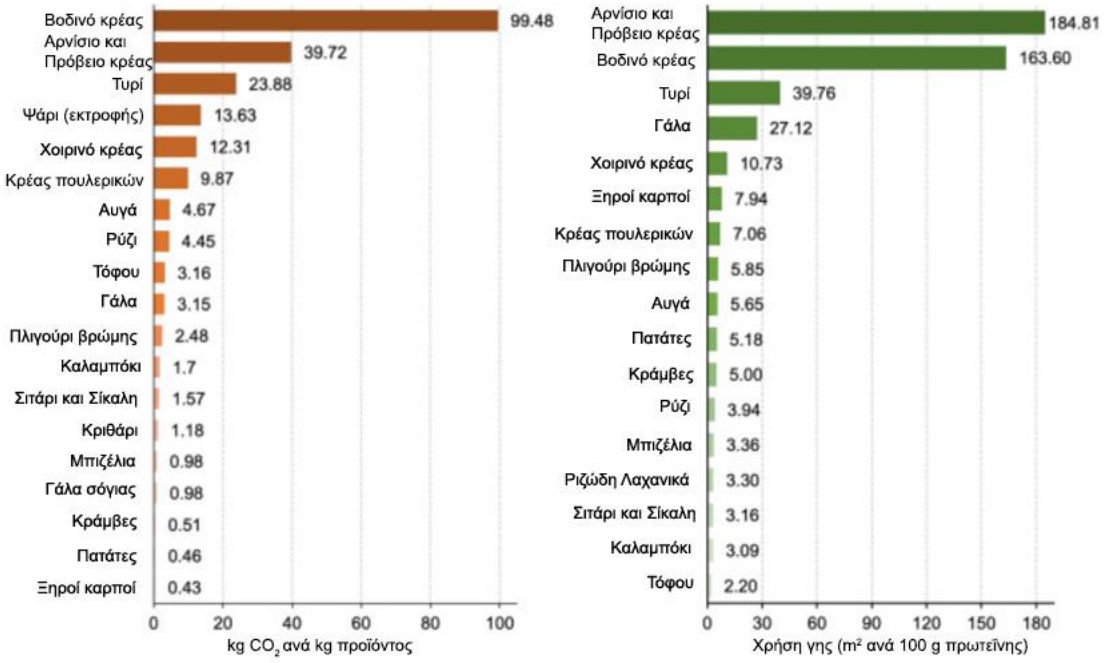
2.1.2 Ζωική πρωτεΐνη

Η ζωική πρωτεΐνη προέρχεται από κρέας, γαλακτομικά, αυγά και ψάρια και είναι γενικά αναγνωρισμένη για την υψηλή θρεπτική της αξία. Αυτό οφείλεται στη σύνθεση των αμινοξέων της, στην αποτελεσματική πέψη της και στην ικανότητά της να μεταφέρει άλλα σημαντικά θρεπτικά συστατικά, όπως το ασβέστιο και το σίδηρο. Επιπλέον, οι λειτουργικές ιδιότητες, όπως η πήξη, η γαλακτωματοποίηση και ο αφρισμός, που προσδίδουν στην τροφή την ελκυστική υφή και τις οργανοληπτικές της ιδιότητες, είναι ανώτερες σε σχέση με τη φυτική πρωτεΐνη (Kim, Wang, & Selomulya, 2020). Οι πρωτεΐνες από ζωικές πηγές, ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες του γάλακτος, είναι σημαντικές για την επαρκή διατροφή του ανθρώπου, και κυρίως των βρεφών, για τη φυσική και ομαλή τους ανάπτυξη. Στις ζωικές πρωτεΐνες, επίσης, έχει αναγνωριστεί η δυνατότητα για αυξημένη μυική ανάπτυξη και βελτιωμένες αθλητικές επιδόσεις, καθιστώντας τες ιδανική επιλογή για αθλητές και γενικότερα ανθρώπους με έφεση στην γυμναστική και στην υγιεινή διατροφή.

Από την άλλη πλευρά η κατανάλωση ζωικών πρωτεϊνών έχει επιφέρει προβλήματα στην εποχή μας. Όσον αφορά την διατροφική αξία οι πηγές ζωικής πρωτεΐνης δεν διαθέτουν εδώδιμες ίνες γεγονός που μπορεί να προκαλέσει προβλήματα με το παχύ έντερο, δυσκοιλιότητα και δυσπεψία. Επίσης μεγάλο ποσοστό του λίπους τους είναι κορεσμένο και μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας όπως αθηροσκλήρωση, υπέρταση, περιφερική αρτηριακή νόσο και εμφάνιση θρομβώσεων.

Γενικότερα η υψηλή κατανάλωση κρέατος είναι άμεσα συνδεδεμένη με παχυσαρκία και άλλες χρόνιες παθήσεις, με την κατανάλωση επεξεργασμένου κρέατος να είναι συνυφασμένη ακόμα και με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης υψηλών καρκινικών δεικτών.

Σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, η βιομηχανία κρέατος ακολουθείται επίσης από μία σειρά αλληλένδετων προβλημάτων. Η έκθεση της Διεθνούς Οργάνωσης Τροφίμων και Γεωργίας για την αντιμετώπιση της κλιματικής αλλαγής μέσω της κτηνοτροφίας (2013) εκτίμησε μια ετήσια εκπομπή 7,1 δισεκατομμυρίων τόνων CO_2 από την κτηνοτροφία (Gerber et al., 2013), η οποία αντιπροσωπεύει το 20% των 35,3 δισεκατομμυρίων τόνων παγκόσμιων εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (Ritchie and Roser, 2020). Μια σύγκριση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από διαφορετικές πηγές τροφίμων δείχνει ότι οι εκπομπές από ζωικές πηγές είναι πάνω από 10 φορές υψηλότερες από εκείνες των φυτικών. Ομοίως, η χρήση γης ανά μονάδα παραγωγής πρωτεϊνών από ζωικές πηγές είναι πάνω από 100 φορές υψηλότερη από αυτή των δημητριακών, όπως υποδεικνύεται και την Εικόνα 2.2. Εκτός από τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, μια αυξημένη στροφή προς τρόφιμα ζωικής προέλευσης οδηγεί επίσης στην εισαγωγή παθογόνων στα συστήματα τροφίμων. Η εισβολή των ανθρώπων σε φυσικούς βιότοπους με σκοπό την περαιτέρω ανάπτυξη της κτηνοτροφίας και του κυνηγιού και την αστικοποίηση οδηγεί σε κατακερματισμό των οικοσυστημάτων που δύναται να προκαλέσει την εμφάνιση μολυσματικών ασθενειών (Newbold et al., 2015). Η ανισορροπία του οικοσυστήματος λόγω της αποψίλωσης των δασών και της απώλειας βιοποικιλότητας είναι ένα άλλο αποτέλεσμα της αλόγιστης κτηνοτροφίας. Ο κίνδυνος απώλειας βιοποικιλότητας μπορεί να μειωθεί με τη μείωση της κτηνοτροφίας.



Εικόνα 2.2 Εκπομπή CO_2 και χρήσης γης ανά τρόφιμο (Li Day et al., 2021)

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, οι πρωτεΐνες από φυτικές πηγές, όπως φυτά, άλγη και έντομα, έχουν προσελκύσει αυξημένο ενδιαφέρον. Οι καταναλωτές αναζητούν όλο και περισσότερο φυτικές επιλογές τροφίμων για λόγους βιωσιμότητας, υγείας και ηθικής, και οι εταιρείες τροφίμων ανταποκρίνονται με πολλές νέες φυτικές εναλλακτικές προτάσεις. Τα προϊόντα φυτικής πρωτεΐνης έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά υφής και γεύσης σε σύγκριση με τα προϊόντα ζωικής πρωτεΐνης. Γενικά, οι φυτικές πρωτεΐνες προσφέρουν πρωτεΐνη χαμηλότερης θρεπτικής αξίας λόγω της μη ισορροπημένης σύνθεσης των αμινοξέων (π.χ. έλλειψη ορισμένων απαραίτητων αμινοξέων, όπως η λυσίνη), και της αργής ή μειωμένης πεπτικότητας. Παρόλα αυτά, διατηρούν καλή πηγή πρωτεΐνης για τον άνθρωπο και μπορούν να συμβάλλουν σε μια ισχυρή διατροφή. Οι εγγενείς δομικές διαφορές μεταξύ των ζωικών και φυτικών πρωτεϊνών καθιστούν δύσκολη την άμεση αντικατάσταση τους σε πολλά προϊόντα, με σημαντικό αντίκτυπο στις οργανοληπτικές ιδιότητες. Ωστόσο, με την ανακάλυψη περισσότερων χαρακτηριστικών για όλους τους τύπους πρωτεϊνών, την τροποποίηση των χαρακτηριστικών τους μέσω επεξεργασίας και την εκμετάλλευση των λειτουργικών τους ιδιοτήτων, δίνεται η δυνατότητα για σχεδιασμό όλο και πιο καινοτόμων φυτικών λύσεων πρωτεΐνης που θα είναι αποδεκτές από τους καταναλωτές.

2.1.3 Διατροφική αξία φυτικών πρωτεϊνών

Για να θεωρηθεί μια πρωτεΐνη ότι διαθέτει εγγενή αξία και αποτελεί ουσιαστική τροφή για τον άνθρωπο, πρέπει να αντιστοιχίζεται σε ορισμένες παραμέτρους. Οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στη θρεπτική αξία μιας πηγής πρωτεΐνης είναι το ποσοστό της πρωτεΐνης στο υλικό, η αφθονία απαραίτητων αμινοξέων, καθώς και η πεπτικότητα της πρωτεΐνης (Li Day et al., 2021).

Δύο σημαντικοί όροι όσον αφορά την διατροφική αξία είναι η βιοδιαθεσιμότητα και η βιοπροσβασιμότητα. Η βιοδιαθεσιμότητα της πρωτεΐνης αναφέρεται στην ποσοστιαία αναλογία της πρωτεΐνης που απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα και φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος και αντικατοπτρίζει την ικανότητα του οργανισμού να την απορροφήσει και να την διανείμει. Η βιοπροσβασιμότητα αναφέρεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης να αφομοιωθεί στο σημείο δράσης του οργανισμού (στην κυτταρική ή ιστική θέση), έτσι ώστε να μπορέσει να εκδηλώσει το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα.

Οι πρωτεΐνες στα τρόφιμα υδρολύονται από τα πεπτικά ένζυμα σε μικρά πεπτίδια και μεμονωμένα αμινοξέα, τα οποία απορροφώνται και χρησιμοποιούνται από το σώμα για τη σύνθεση πρωτεϊνικών ιστών (ανάπτυξη και αποκατάσταση), καταβολίζονται για να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες ή χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση άλλων ενώσεων που περιέχουν άζωτο, όπως οι ορμόνες και οι νευροδιαβιβαστές (Atherton, Smith, Etheridge, Rankin, & Rennie, 2010).

2.1.3.1 Σύνθεση αμινοξέων

Εννέα από τα είκοσι αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από το ανθρώπινο σώμα και έτσι αναφέρονται ως απαραίτητα. Αυτά είναι η ιστιδίνη, η λυσίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη. Άλλα αμινοξέα, όπως η αργινίνη, η γλουταμίνη, η γλυκίνη, η ορνιθίνη, η προλίνη και η σερίνη, θεωρούνται «ενδεχομένως απαραίτητα»

καθώς είναι πιο σημαντικά σε συγκεκριμένες περιόδους της ζωής, όπως κατά την πρώιμη ανάπτυξη και σε περιόδους ασθένειας ή στρες. Τα υπόλοιπα αμινοξέα θεωρούνται «μη απαραίτητα», καθώς μπορούν να συντεθούν από το σώμα.

Η μοναδική πηγή των απαραίτητων αμινοξέων είναι η διατροφή. Τα γαλακτοκομικά, η σόγια, τα αυγά και το κρέας θεωρούνται πλήρεις πηγές πρωτεΐνης, καθώς περιέχουν όλα τα εννέα αυτά αμινοξέα σε επαρκείς αναλογίες για τις ανάγκες του ανθρώπινου σώματος. Όταν λείπει ένα ή περισσότερα αμινοξέα από μια πηγή πρωτεΐνης, αυτό μπορεί να περιορίσει την ικανότητα σύνθεσης πρωτεϊνών στο ανθρώπινο σώμα, με αποτελέσμα να μην επιτελούνται βασικές λειτουργίες του οργανισμού και να μην εκλύονται απαραίτητες ουσίες, όπως οι ορμόνες που ρυθμίζουν πλήθος διεργασιών στο ανθρώπινο σώμα. Οι πρωτεΐνες από ζωικές πηγές διαφέρουν από εκείνες των φυτικών πηγών. Επίσης υπάρχει ανομοιομορφία μεταξύ των διαφορετικών ειδών της ίδιας κατηγορίας πηγής. Για παράδειγμα, τα επίπεδα λυσίνης και θρεονίνης στις περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες, ιδιαίτερα στις πρωτεΐνες από δημητριακά, είναι σημαντικά χαμηλότερα από τις ζωικές πρωτεΐνες, εκτός από την κινόα. Ωστόσο, η κινόα είναι χαμηλή σε ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη σε σχέση με τη βρώμη, τον αρακά και τη σόγια. Η λυσίνη βοηθά το σώμα να απορροφήσει το ασβέστιο και παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία κολλαγόνου, το οποίο είναι σημαντικό για τα οστά και τους συνδετικούς ιστούς (Civitelli et al., 1992), με την απουσία της από τον οργανισμό δυνητικά να προκαλεί προβλήματα με την λειτουργία των οστών και των λειτουργιών τους.

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, λευκίνη, βαλίνη και ισολευκίνη, θεωρείται ότι ενισχύουν την ανάπτυξη των μυών και βελτιώνουν τις επιδόσεις στην άσκηση, αν και οι επιδράσεις τους εξαρτώνται πιθανώς από τη διατροφική κατάσταση του ατόμου (Bifari & Nisoli, 2017). Η λευκίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση και διατήρηση της μυϊκής μάζας και στην διατήρηση χαμηλών ποσοστών λίπους. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη των μυών και τη βιοσύνθεση των μιτοχονδρίων, αποτρέποντας έτσι τη φθορά των μυών με την ηλικία (Sun & Zemel, 2009). Τα συστατικά και τα συμπυκνώματα γαλακτοκομικών πρωτεϊνών περιέχουν υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε λευκίνη. Ωστόσο, ορισμένες φυτικές πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες στο ρύζι, μπορούν επίσης να παρέχουν παρόμοιο επίπεδο λευκίνης με τις ζωικές πρωτεΐνες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3. Πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η λευκίνη αποτελεί υψηλό ποσοστό της πρωτεΐνης σε αυτές τις πηγές, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η πεπτικότητα είναι σχετικά χαμηλές, οπότε δεν θεωρούνται καλές πηγές λευκίνης.

Σε σχέση με τις ζωικές πηγές, οι φυτικές πηγές γενικά έχουν χαμηλότερα επίπεδα τρυπτοφάνης. Η τρυπτοφάνη παίζει ρόλο στην παραγωγή σεροτονίνης, μελατονίνης, νιασίνης και νικοτιναμίδης, με υψηλότερη πρόσληψη να οδηγεί σε μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και άγχους (Lindseth, Helland, & Caspers, 2015). Τα επίπεδα μεθειονίνης και κυστεΐνης στις πρωτεΐνες δημητριακών είναι παρόμοια με τις ζωικές πρωτεΐνες, ωστόσο, τείνουν να είναι χαμηλότερα στις πρωτεΐνες των οσπρίων. Η μεθειονίνη εμπλέκεται στη σύνθεση της κυστεΐνης μέσω της οδού της μεταθειόλυσης, η οποία είναι περιοριστικός παράγοντας για το βασικό αντιοξειδωτικό μόριο, τη γλουταθειόνη. Η μεθειονίνη είναι επίσης ο κύριος δωρητής μεθυλίου στο σώμα, που εμπλέκεται στη σύνθεση αρκετών βασικών μεταβολιτών, όπως η κρεατίνη και η φωσφατιδυλοχολίνη, σε περιόδους ενεργής ανάπτυξης (Elango, 2020).

Σημαντικό μειονεκτήμα της σύνθεσης αμινοξέων των φυτικών πηγών αποτελούν τα χαμηλά επίπεδα λυσίνης. Σύμφωνα με την Εικόνα 2.3, τα επίπεδα λυσίνης των δημητριακών είναι σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των ζωικών πηγών. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα λυσίνης στο αυγό είναι 78 mg/gπρωτεΐνης, ενώ στην βρώμη μόλις 43 mg/g πρωτεΐνης.

Για να αξιοποιήσει το ανθρώπινο σώμα την πρωτεΐνη της διατροφής με τον μέγιστο δυνατό τρόπο, πρέπει να υπάρχει άμεσα διαθέσιμη προσφορά όλων των απαραίτητων αμινοξέων. Η παροχή τους μπορεί να προέρχεται από φυτική ή ζωική πηγή. Όταν αυτά λείπουν, πρέπει να παρέχονται συμπληρωματικές πηγές πρωτεΐνης για να εξασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα πρωτεΐνης και η επακόλουθη θρεπτική αξία.

Απαραίτητα αμινοξέα	Βασικά		Ουδέτερα	Ουδέτερα (διακλαδισμένης αλυσίδας)			Αρωματικά		Θειούχα
(mg/g πρωτεΐνης)	Ιστιδίνη	Λυσίνη	Θρεονίνη	Ισολευκίνη	Λευκίνη	Βαλίνη	Φαινυλαλανίνη + Τυροσίνη	Τρυπτοφάνη	Μεθειονίνη + Κυστεΐνη
Ζωικές πρωτεΐνες									
Αγελαδινό γάλα	28	84	47	53	99	65	95	14	30
Πρωτεΐνη ορού γάλακτος	16	109	88	74	121	69	75	17	52
Μοσχάρι	31	70	36	40	65	46	61	10	35
Κοτόπουλο	34	100	46	52	85	51	40	δ.ο.	31
Αυγό	25	78	51	57	91	64	98	12	47
Φυτικές πρωτεΐνες									
Αλεύρι σίτου	26	27	31	37	75	47	85	13	41
Βρώμη	25	43	35	39	76	54	91	9	43
Ρύζι	26	28	37	45	88	63	82	14	44
Σόγια	28	73	47	54	90	55	99	16	31
Φακές	29	69	44	35	71	46	71	5	26
Φιστίκια	25	39	22	35	70	40	88	7	16

Εικόνα 2.3 Σύνθεση αμινοξέων διαφόρων πηγών πρωτεΐνης (Li Day et al., 2021)

2.1.3.2 Πεπτικότητα

Ένα άλλο σημαντικό μέτρο για την αξιολόγηση μιας πρωτεΐνης αποτελεί η πεπτικότητα. Η πεπτικότητα είναι η ικανότητα ενός ανθρώπου ή ζώου να αποσυνθέτει τις πρωτεΐνες σε αμινοξέα και να απορροφά αυτά και η μέτρησή της αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αξιολόγηση της ποιότητας μιας πρωτεΐνης (Mougħan, Gilani, Rutherfurd, & Tome, 2012). Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν εργαστηριακές δοκιμές πεπτικότητας πρωτεϊνών (χρησιμοποιώντας οξέα και πεπτικά ένζυμα), μακριά από τις φυσικές συνθήκες ενός ζωντανού οργανισμού (in vitro) ή αντίθετα, με σίτιση ζώων και στη συνέχεια μέτρηση των μη απορροφημένων αμινοξέων στα κόπρανα και στο λεπτό έντερο μετά το γεύμα, αξιοποιώντας δεδομένα προερχόμενα από τα ζώα (in vivo). Η εγκυρότητα της εξαγωγής δεδομένων από ένα είδος σε άλλο (π.χ. δοκιμές σε ζώα για ανθρώπους) εξαρτάται από την ομοιότητα στον μεταβολισμό και τη φυσιολογία του εντέρου, π.χ. οι αναπτυσσόμενοι χοίροι θεωρούνται καλό μοντέλο για την πέψη στους ενήλικες ανθρώπους (FAO, 2013).

Το PDCAAS (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score) και το DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score) είναι μέθοδοι μέτρησης της διατροφικής αξίας των πρωτεϊνών. Το PDCAAS αποτελεί μέθοδο αξιολόγησης της ποιότητας μιας πρωτεΐνης βάσει τόσο των απαραίτητων

αμινοξέων όσο και της ικανότητάς της να αφομοιώνεται. Στη βιβλιογραφία οι τιμές PDCAAS συνήθως αναφέρονται ως κλάσμα, λαμβάνοντας τιμές από 0% έως 100%. Το PDCAAS μετρά την πεπτικότητα από το άζωτο στα κόπρανα. Το PDCAAS αντικαταστάθηκε το 2011 από το DIAAS, το οποίο θεωρείται πιο ακριβής μέθοδος μέτρησης της θρεπτικής αξίας της πρωτεΐνης, καθώς λαμβάνει υπόψη την πεπτικότητα στο ειλεό. Το DIAAS καθορίζει την πεπτικότητα κάθε αμινοξέος, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία ή θέρμανση ή που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αντιθρεπτικών παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα ή την πεπτικότητα των διαφορετικών αμινοξέων (Gilani, Tomé, Mougham, Burlingame, & Rutherford, 2012; Mougham, 2003). Ένα σκορ DIAAS 100 σημαίνει ότι η ποιότητα της δοκιμαστικής πρωτεΐνης είναι ίση με την ποιότητα της αναφοράς πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης τείνουν να έχουν καλύτερα σκορ στα απαραίτητα αμινοξέα και καλύτερη πεπτικότητα σε σχέση με αυτές φυτικής προέλευσης και έτσι οι ζωικές πηγές χρησιμοποιούνται ως αναφορά πρωτεΐνης. Η μεθοδολογία DIAAS είναι πλέον η συνιστώμενη προτιμώμενη μέθοδος (FAO, 2013).

Η πεπτικότητα είναι συγκεκριμένη για το κάθε τρόφιμο ή συστατικό. Για να διευκολύνουν την πέψη τους, τα αμινοξέα πρέπει να απελευθερώνονται στο έντερο κατά την πέψη με τη μορφή ελεύθερων αμινοξέων ή πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους, όπου οι πλευρικές αλυσίδες του αμινοξέος βρίσκονται στην αρχική τους μορφή. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την πεπτικότητα. Οι πρωτεΐνες περιέχουν διασταυρούμενους δεσμούς εντός ή μεταξύ των μορίων τους, είτε φυσικά είτε ως αποτέλεσμα χημικής, φυσικής ή βιολογικής επεξεργασίας. Η διασταύρωση της πρωτεΐνης μπορεί να μειώσει την πεπτικότητα περιορίζοντας την αποδόμηση και εμποδίζοντας την πρόσβαση των ενζύμων στους δεσμούς πεπτιδίων σε πεπτικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, η β-καζεΐνη που διασταυρώνεται με τη τρανσγλουταμινάση είναι πιο ανθεκτική στην πεψίνη (Monogioudi et al., 2011). Χημική διασταύρωση της πρωτεΐνης αυγού με γλουταραλδεΰδη ή μεθυλογλυξάλη μπορεί να αναστείλει την υδρόλυση από τη τρυψίνη και τη χυμοτρυψίνη, όπως και οι αντιδράσεις Maillard μεταξύ πρωτεϊνών και σακχάρων (Lassé et al., 2015). Επίσης, η χημική πλευρική αλυσίδα ενός ή περισσότερων απαραίτητων αμινοξέων μπορεί να αντιδράσει και να παράξει θρεπτικά αδρανείς ή/και τοξικές μορφές. Τα ισχυρά όξινα, αλκαλικά ή οξειδωτικά περιβάλλοντα μπορούν να τροποποιήσουν χημικά τη λυσίνη, τη σερίνη, τη κυστεΐνη και τη μεθειονίνη σε παράγωγα όπως η λυσινοαλανίνη, το κυστεϊκό οξύ και το μεθειονικό σουλφοξείδιο. Αυτά τα παράγωγα δεν είναι θρεπτικά διαθέσιμα και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι τοξικά (Gilani, Xiao, & Cockell, 2012). Ακόμη, τρόφιμα δύναται να περιέχουν αντιθρεπτικούς παράγοντες που αναστέλλουν τα πεπτικά ένζυμα ή/και δεσμεύουν την πρωτεΐνη/αμινοξέα. Ορισμένες πηγές φυτικής πρωτεΐνης περιέχουν πρωτεΐνες ή πολυμερή σακχάρων που αναστέλλουν τα πεπτικά ένζυμα. Επί παραδείγματι η σόγια περιέχει αναστολείς της τρυψίνης, οι οποίοι αναστέλλουν την πέψη στο λεπτό έντερο (Sathe, 2012). Ακόμα, οι πολυφαινόλες, όπως οι τανίνες, μπορούν να δεσμεύσουν ισχυρά τις πρωτεΐνες, καθιστώντας τες μη διαθέσιμες για πέψη (Stern, Hagerman, Steinberg, & Mason, 1996).

	0-6 μηνών		6 μηνών - 3 ετών		3 ετών - ενήλικας	
	PDCAAS	DIAAS	PDCAAS	DIAAS	PDCAAS	DIAAS
Ζωικές πρωτεΐνες						
Άπαχο γάλα σε σκόνη	88	81	100*	105	100*	123
Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος	66	67	97	100	100*	125
Κοτόπουλο			100*	108		
Φυτικές πρωτεΐνες						
Σιτάρι	42	37	51	45	51	54
Σόγια (αλεύρι)	72	73	93	89	100*	105
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης μπιζελιού	49	45	71	62	84	73

Εικόνα 2.4 Πεπτικότητα ορισμένων πρωτεϊνικών πηγών (Li Day et al., 2021)

Συμπερασματικά, οι ζωικές πρωτεΐνες παρέχουν τα απαραίτητα αμινοξέα πιο αποτελεσματικά από τις φυτικές, λόγω της σύνθεσης αμινοξέων και της υψηλής πεπτικότητας. Δύο ή περισσότερες πηγές φυτικών πρωτεϊνών με συμπληρωματικά προφίλ αμινοξέων μπορούν να συνδυαστούν με σκοπό να ληφθούν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε επαρκείς ποσότητες, αλλά η χαμηλή πεπτικότητα παραμένει σημαντικό πρόβλημα με επιπτώσεις στην υγεία και την ανάπτυξη του ανθρώπου, ιδιαίτερα για τα βρέφη και τα μικρά παιδιά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4. Υπάρχει επείγουσα ανάγκη για τεχνολογίες που να βελτιώνουν την πέψη των φυτικών πρωτεϊνών, π.χ. μέσω επιλεκτικής γεωργίας ή γενετικής τροποποίησης, ενίσχυσης με απαραίτητα αμινοξέα (van Vliet, Burd, & van Loon, 2015) ή προσεγγίσεων επεξεργασίας που αυξάνουν την πεπτικότητα επιλύοντας τα δομικά εμπόδια για τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοπροσβασιμότητα των αμινοξέων (Salazar-Villanea, Hendriks, Bruininx, Gruppen, & Van Der Poel, 2016; Tamayo Tenorio, Kyriakopoulou, Suarez-Garcia, van den Berg, & van der Goot, 2018). Ωστόσο, ο συνδυασμός φυτικών πρωτεϊνών με ζωικές μπορεί πιο άμεσα να υπερβεί αυτούς τους περιορισμούς (Rutherfurd, Fanning, Miller, & Moughan, 2015).

2.2 Η βιομηχανία ελαιούχων σπόρων

Ως ελαιούχοι σπόροι αναφέρονται οι σπόροι των φυτών που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή λαδιού. Υπάρχουν πολλά είδη ελαιούχων σπόρων, συμπεριλαμβανομένων της ελαιοκράμβης, της σόγιας και του βαμβακόσπορου. Αν και διαφορετικοί ελαιούχοι σπόροι έχουν διαφορετική χημική σύνθεση, όλοι περιέχουν πρωτεΐνες, λίπη, ζάχαρη, άμυλο, βιταμίνες, νερό και μέταλλα (Arrutia et al., 2020). Οι ελαιούχοι σπόροι περιέχουν τουλάχιστον 15% λίπους, ενώ την ίδια στιγμή αποτελούν επίσης σημαντική πηγή πρωτεΐνης σε ποσότητα περίπου 6%-45% (Kotecka-Majchrzak et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια, οι σπόροι και τα έλαια που προέρχονται από ελαιούχους σπόρους έχουν γίνει ολοένα και πιο δημοφιλείς προσθήκες στα τρόφιμα, έτσι η καλλιέργεια ελαιούχων φυτών παγκοσμίως αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς.

Σημαντικό μέρος της παγκόσμιας βιομηχανίας αποτελεί η παραγωγή βρώσιμων ελαίων, η οποία συγκεκριμένα το 2021 ανερχόταν σε 600 εκατομμύρια τόνους όσον αφορά υψηλής διατροφικής αξίας ελαιούχους σπόρους. Η σόγια είναι ένας από τους σημαντικότερους ελαιούχους σπόρους στον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας το 60% της παραγωγής, ενώ αποτελεί καλλιεργήσιμο σπόρο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, σε ποσοστό περίπου 33%-56% πρωτεΐνη και 20% λίπος (Ciabotti et al., 2016).

Η ελαιοκράμβη, παράλληλα, αποτελεί τον πιο διαδεδομένο σπόρο στην Κίνα, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 40% της συνολικής καλλιέργειας ελαιούχων σπόρων της χώρας. Το κραμβέλαιο είναι κοινώς γνωστό ως λάδι κανόλα και αντιπροσωπεύει σχεδόν το 20% της παγκόσμιας προσφοράς βρώσιμων ελαίων. Συνιστάται από πολλούς διατροφολόγους λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λιποδιαλυτές βιταμίνες και ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως ωμέγα-3 και ωμέγα-6, ενώ επίσης περιέχει χαμηλή περιεκτικότητα σε χοληστερόλη (Aider & Barbana, 2011). Η ελαιοκράμβη δεν είναι πλούσια μόνο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, αλλά και σε πρωτεΐνες, οι οποίες συναντώνται σε ποσοστό περίπου 38,0%. (Tan et al., 2011). Επίσης, ο ηλιόσπορος είναι ένας εγγενής ελαιούχος σπόρος στη Βόρεια Αμερική. Καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο και είναι ένας από τους σημαντικότερους ελαιούχους σπόρους για την παραγωγή μαγειρικού λαδιού και βιοντίζελ. Ο ηλιόσπορος περιέχει περίπου 8,6% εδώδιμες ίνες, 21,0% πρωτεΐνη και 47,5% ακατέργαστο λίπος (Morya et al., 2022). Επιπλέον, οι ηλιόσποροι περιέχουν μέταλλα, βιταμίνες Β, απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα και συστατικά με υψηλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, που καθιστούν τους ηλιόσπορους συστατικό καλής διατροφής.

2.2.1 Μέθοδοι ανάκτησης ελαίων

Η βιομηχανία ελαιούχων σπόρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια αγορά, παρέχοντας ποικίλα προϊόντα με μοναδικές χημικές ιδιότητες και διατροφική αξία. Η εξαγωγή των συγκεκριμένων ελαίων βρίσκει εφαρμογή στην παρασκευή τροφίμων, την παραγωγή καυσίμων, ακόμη και στην βιομηχανία καλλυντικών. Η εκχύλιση του ελαίου δύναται να πραγματοποιηθεί με μηχανικές, χημικές, αλλά και καινοτόμες μεθόδους, όπως υπερκρίσιμη εκχύλιση και ενζυμική κατεργασία.

Οι μηχανικές μέθοδοι εκχύλισης είναι κρίσιμες στην εκχύλιση ελαιούχων σπόρων λόγω της αποτελεσματικότητάς τους και της φιλικότητάς τους προς το περιβάλλον. Αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν χημικές ουσίες, γεγονός που τις καθιστά ασφαλέστερες τόσο για το περιβάλλον όσο και για τους παραγωγούς. Επιπλέον, τείνει να διατηρεί την συνοχή του ελαίου, επιτρέποντας στο τελικό προϊόν να διατηρήσει περισσότερο την αρχική του γεύση και τα θρεπτικά του οφέλη. Οι κύριες μηχανικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ψυχρή έκθλιψη και την έκθλιψη με εκχύλιση, καθεμία με μοναδικές διαδικασίες και οφέλη. Η ψυχρή έκθλιψη είναι μια ήπια μέθοδος εκχύλισης που περιλαμβάνει την μηχανική έκθλιψη ελαιούχων σπόρων χωρίς την εφαρμογή εξωτερικής θερμότητας. Αυτή η τεχνική έχει κερδίσει δημοτικότητα επειδή αποτρέπει την υποβάθμιση ευαίσθητων ενώσεων. Είναι ιδιαίτερα προτιμώμενη για έλαια που προέρχονται από σπόρους όπως ο λιναρόσπορος και οι ελιές. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ιδιαίτερα ενδεδειγμένη για έλαια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε μαγειρικές εφαρμογές, καθώς, λόγω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα, η φυσική γεύση του ελαίου παραμένει ακέραια και επίσης δεν αλλοιώνονται τα θρεπτικά συστατικά, μεταξύ των οποίων οι βιταμίνες και τα αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, λόγω της ελάχιστης επεξεργασίας που υφίσταται το έλαιο, απουσία πρόσθετων και συντηρητικών, αποτελεί ελκυστική επιλογή για καταναλωτές, οι οποίοι ενδιαφέρονται για την υγεία τους. Παρά τα πολλαπλά οφέλη της, η ψυχρή έκθλιψη έχει και ορισμένους περιορισμούς. Η απόδοση σε έλαιο τείνει να είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, με αποτέλεσμα να έχει υψηλότερο κόστος παραγωγής. Παράλληλα, η διαδικασία συνήθως είναι χρονοβόρα, γεγονός που

επιβαρύνει οικονομικά τις μεγάλης κλίμακας επιχειρήσεις. Όσον αφορά την έκθλιψη με εκχύλιση, αυτή είναι μια εξίσου διαδεδομένη μέθοδος μηχανικής εκχύλισης. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί μια κοχλιωτή πρέσα για την εξαγωγή ελαίου από σπόρους εφαρμόζοντας μηχανική πίεση και, συχνά, θερμότητα που παράγεται από την τριβή. Σε αντίθεση με την ψυχρή έκθλιψη, οι θερμοκρασίες μπορούν να αυξηθούν σημαντικά, μερικές φορές έως και τους 120 °C. Σε αντίθεση με την ψυχρή έκλθλιψη, παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση σε ανάκτηση ελαίου από την ίδια ποσότητα σπόρων, γεγονός που την καθιστά αποτελεσματικότερη και οικονομικά συμφέρουσα διεργασία. Επίσης δύναται να αξιοποιήσει ευρύτερη ποικιλία ελαιούχων σπόρων σε σχέση με την ψυχρή έκθλιψη και με μεγαλύτερη ταχύτητα επεξεργασίας, καθιστώντας την δημοφιλή για βιομηχανικές εφαρμογές. Ενώ η έκθλιψη με εκχύλιση είναι οικονομικά συμφέρουσα μέθοδος, επηρεάζει τη σύνθεση του ελαίου. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να οδηγήσουν στην απώλεια ορισμένων θρεπτικών συστατικών και γεύσης.

Έκτος της χρήσης μηχανικών τεχνικών, η εκχύλιση των ελαίων από ελαιούχους σπόρους μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω χημικών μεθόδων. Οι χημικές τεχνολογίες εκχύλισης, και ιδιαίτερα η εκχύλιση με διαλύτη, έχουν φέρει επανάσταση στη βιομηχανία ελαιούχων σπόρων, καθώς επιτρέπουν την αποτελεσματική επεξεργασία των σπόρων, αποδίδοντας μεγαλύτερες ποσότητες ελαίου σε σύγκριση με τις μηχανικές μεθόδους. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της αυξανόμενης ζήτησης για φυτικά έλαια παγκοσμίως. Η εκχύλιση με διαλύτη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον διαχωρισμό του ελαίου από τους ελαιούχους σπόρους. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη χρήση ενός διαλύτη, συνήθως εξανίου, για την εκχύλιση του ελαίου. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης από το μείγμα μέσω εξάτμισης, αφήνοντας πίσω το εκχυλισμένο έλαιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος διακρίνεται για την αποτελεσματικότητά της, καθώς παρέχει ανακτήσεις ελαίου πάνω από 95%, σημαντικά μεγαλύτερες σε σύγκριση με τις μηχανικές μεθόδους. Επιπλέον, προσφέρει ευελιξία εφαρμογής και οικονομική αποτελεσματικότητα καθώς δίνει την δυνατότητα για εφαρμογή σε διάφορους τύπους ελαίων με μειωμένο κόστος ανά μονάδα παραγόμενου ελαίου. Παρά τα πλεονεκτήματά της, υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με τα υπολείμματα διαλύτη στο τελικό προϊόν. Τα κανονιστικά πρότυπα διασφαλίζουν ότι αυτά τα υπολείμματα παραμένουν εντός ασφαλών ορίων, αλλά αποτελεί έναν τομέα που απαιτεί συνεχή προσοχή.

Παράλληλα με τις συμβατικές τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει δοθεί βάση και σε καινοτόμες μεθόδους ανάκτησης ελαίου, όπως η υπερκρίσιμη εκχύλιση. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών. Τα υπερκρίσιμα ρευστά προκύπτουν όταν οι ουσίες σε υγρή φάση υποβληθούν σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις και παρουσιάζουν ιδιότητες τόσο υγρών όσο και αερίων. Σε αυτήν την κατάσταση, το ρευστό μπορεί να διεισδύσει αποτελεσματικότερα στο φυτικό υλικό και να διαλυτοποιήσει τις ενώσεις-στόχους, ενισχύοντας την εκχύλιση. Στην υπερκρίσιμη εκχύλιση συνήθως χρησιμοποιείται διοξείδιο του άνθρακα. Η σημασία της εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό έγκειται στην ικανότητά της να παράγει έλαια υψηλής ποιότητας με βελτιωμένη απόδοση σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους. Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη για το φιλικό προς το περιβάλλον προφίλ της, καθώς συχνά απαιτεί λιγότερους διαλύτες και παράγει λιγότερα απόβλητα.

2.2.2 Εφαρμογές ελαίων

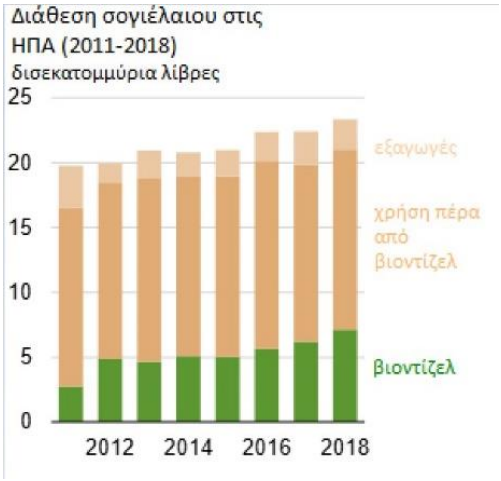
Η εφαρμογή των εκχυλισμένων ελαίων αντιπροσωπεύει ένα κρίσιμο τμήμα της διαδικασίας εκχύλισης ελαιούχων σπόρων, υπογραμμίζοντας τους πολύπλευρους ρόλους που διαδραματίζουν αυτά τα προϊόντα στην παγκόσμια βιομηχανία. Τα εκχυλισμένα έλαια είναι πολύτιμα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για τις μοναδικές χημικές τους ιδιότητες και τα διατροφικά τους οφέλη.

Τα φυτικά έλαια είναι βασικά συστατικά στις κουζίνες παγκοσμίως. Εκπληρώνουν διάφορους ρόλους στο μαγείρεμα, ειδικά στην ενίσχυση της γεύσης και της υφής στα πιάτα. Συνήθη παραδείγματα περιλαμβάνουν το ηλιέλαιο, το ελαιόλαδο και το λάδι κανόλα. Επίσης, αυτά τα έλαια διαθέτουν ιδιαίτερα διατροφικά στοιχεία. Πολλά φυτικά έλαια είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά, τα οποία συμβάλλουν στην καλή λειτουργία της καρδιάς. Έλαια όπως το ελαιόλαδο συχνά προωθούνται για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και τα πιθανά οφέλη για την υγεία, καθιστώντας τα δημοφιλείς επιλογές για καταναλωτές που προτιμούν να διατηρούν μια ισορροπημένη διατροφή.

Εικόνα 2.5 Έλαια χρησιμοποιούμενα στην μαγειρική (uchealth.org)

Πέρα από την χρήση τους σε μαγειρικές εφαρμογές, στην παγκόσμα βιομηχανία χρησιμοποιούνται εκχυλισμένα έλαια με πολλούς τρόπους. Αυτά τα έλαια είναι αναπόσπαστο κομμάτι των διαδικασιών παραγωγής και χρησιμεύουν ως πρώτες ύλες για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων. Όσον αφορά την βιομηχανία ορυκτών καυσίμων, τα φυτικά έλαια, και ιδιαίτερα η κανόλα και η σόγια, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την παραγωγή βιοντίζελ. Αυτό το εναλλακτικό καύσιμο βοηθά στη μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα και μειώνει τις εκπομπές άνθρακα. Στην Εικόνα 2.6 φαίνεται η αυξανόμενη διάθεση του σογιέλαιου στις ΗΠΑ για την παραγωγή βιοντίζελ. Επίσης πολλά βιομηχανικά λιπαντικά προέρχονται από φυτικά έλαια. Η ικανότητα τους για βιοδιάσπαση παρέχει μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση στα λιπαντικά με βάση το πετρέλαιο, απαραίτητη για βιώσιμες πρακτικές. Από την άλλη πλευρά, τα εκχυλισμένα έλαια έχουν εξέχοντα ρόλο στις βιομηχανίες καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Οι ευεργετικές τους ιδιότητες επιτρέπουν ποικίλες εφαρμογές που ενισχύουν την υγεία του δέρματος και προάγουν την ευεξία. Έλαια όπως το χοχόμπα και του αμυγδάλου χρησιμοποιούνται συνήθως σε σκευάσματα περιποίησης δέρματος για τις ενυδατικές τους ιδιότητες. Αυτά τα έλαια διεισδύουν αποτελεσματικά

στο δέρμα, χωρίς να φράζουν τους πόρους. Παράλληλα, τα αιθέρια έλαια προέρχονται από διάφορους ελαιούχους σπόρους και εξυπηρετούν θεραπευτικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, το έλαιο μέντας και το έλαιο λεβάντας είναι δημοφιλή στην αρωματοθεραπεία για χαλάρωση και βελτίωση της διάθεσης.



Εικόνα 2.6 Διάθεση σογιέλαιου στις ΗΠΑ (eia.gov)

2.2.3 Εφαρμογές πρωτεϊνών ελαιούχων σπόρων

Οι ελαιούχοι σπόροι βρίσκουν εφαρμογή και σε ποικίλες διεργασίες της βιομηχανίας τροφίμων με σκοπό την κάλυψη των αναγκών της εκάστοτε κοινωνίας. Καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, εντείνεται η ανάγκη για βιώσιμες διατροφικές λύσεις. Πολλοί άνθρωποι στρέφονται πλέον σε φυτικές πρωτεΐνες ως εναλλακτική των ζωικών, επιδιώκοντας όχι μόνο την κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών, αλλά και τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος. Οι φυτικές πρωτεΐνες προσφέρουν σημαντικά οφέλη για την υγεία και αποτελούν μια πιο φιλική προς το περιβάλλον επιλογή, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση ενός πιο βιώσιμου διατροφικού μοντέλου για το μέλλον. Έτσι η απομόνωση πρωτεϊνών από ελαιούχους σπόρους κρίνεται συμφέρουσα.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αξιοποίησης πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης αποτελεί η σόγια, η ελαιοκράμβη, ο ηλίανθος και το σουσάμι. Υπάρχουν πολλά διαδεδομένα προϊόντα σόγιας, όπως το τόφου και το γάλα σόγιας. Η σόγια είναι πλούσια σε πρωτεΐνη και περιέχει μια ποικιλία αμινοξέων, ιδιαίτερα απαραίτητων αμινοξέων, όπως βαλίνη, ισολευκίνη και λυσίνη. Κρίνεται ότι η θρεπτική αξία της σόγιας είναι περίπου ισοδύναμη με αυτή του κρέατος, του γάλακτος και των αυγών (Semba et al., 2021). Στην Κίνα, η σόγια χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή εναλλακτικών κρεάτων, ενώ και παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση προϊόντων διατροφής με βάση τη σόγια έχει αποκτήσει υψηλή δημοτικότητα. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες ελαιοκράμβης, αυτές χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη και παραγωγή τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων προϊόντων αρτοποιίας, ποτών, γαλακτοκομικών και υποκατάστατων αυγών, προϊόντων κρέατος και καρυκευμάτων. Έρευνες που

έχουν διεξαχθεί έχουν δείξει ότι η προσθήκη πρωτεΐνης ελαιοκράμβης μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τη θρεπτική αξία των προϊόντων κρέατος, ενώ δεν παρουσιάζει μεγάλη επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες. Η προσθήκη πρωτεΐνης ελαιοκράμβης σε χορτοφαγικό μπιφτέκι ενίσχυσε την σύνθεση αμινοξέων του προϊόντος και παρουσίασε παρόμοια υφή με αντίστοιχο μπιφτέκι κρέατος (Guo et al., 2010). Επιπλέον, ο ηλίανθος μπορεί να προστεθεί σε διάφορα είδη τροφίμων, όπως ψωμί, μπισκότα ή άλλα τρόφιμα (Aly et al., 2021). Τέλος, οι σπόροι σουσαμιού χρησιμοποιούνται συνήθως για τρεις σκοπούς: ως πρόσθετο σε σαλάτες, ταχίνι και σησαμέλαιο (Saatchi et al., 2019). Θεωρείται ότι οι σπόροι σουσαμιού και η πρωτεΐνη τους παρέχουν πολλά οφέλη για την υγεία, όπως μείωση των υψηλών λιπιδίων του αίματος, της χοληστερόλης και της πίεσης, νευροπροστατευτική δράση, επούλωση πληγών, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες κ.λπ. (Abirached et al., 2020, Deme et al., 2018).

Η αξιοποίηση των πρωτεϊνών ελαιούχων σπόρων, ωστόσο, ενέχει προκλήσεις λόγω ορισμένων χημικών ενώσεων, που περιέχουν, και δυσχεραίνεται η άμεση προσθήκη τους σε τρόφιμα, με αποτέλεσμα η κύρια χρήση τους να περιορίζεται ως ζωοτροφές. Συνεπώς, τόσο τα παραπροιόντα σόγιας όσο και του σουσαμιού χρησιμοποιούνται κατά αυτόν τον τρόπο, αν και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (περίπου 17,0%-40,0%) (Achouri et al., 2012, Saatchi et al., 2019), Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί και ο ηλίανθος, ο οποίος αν και αποτελεί μια βιώσιμη και εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης, η ανάπτυξη της σε προϊόντα διατροφής έχει παρεμποδιστεί από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών ενώσεων όπως τα χλωρογενικά οξέα που προκαλούν ανεπιθύμητο σκούρο χρώμα και πρασίνισμα λόγω του σχηματισμού συμπλεγμάτων χλωρογενικού οξέος οξειδωμένα με πρωτεΐνη ηλίανθου (Giarola, 20th. 2016).

2.2.4 Άλευρα παραπροϊόντων ελαιούχων σπόρων

Ως παραπροϊόντα της εκχύλισης ελαιούχων σπόρων για βρώσιμο λάδι, οι πίτες ελαιούχων σπόρων έχουν επίσης μελετηθεί ευρέως. Μετά την άλεση της πίτας αυτής προκύπτει το άλευρο, αποτελώντας μία σημαντική πηγή πρωτεΐνης. Η απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς, από την μία, η χρήση παραπροϊόντων συμβάλλει στην κυκλική οικονομία και, από την άλλη, αξιοποιείται η διατροφική αξία των φυτικών πρωτεϊνών.

Το άλευρο που λαμβάνεται από απαλλαγμένους από έλαιο σπόρους έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από τους σπόρους, η οποία διαθέτει σημαντικές ιδιότητες. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε απελαιωμένα άλευρα από σόγια, φιστίκια, σουσάμι και σπόρους chia τείνει να είναι πάνω από 30%. Από αυτές, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο σουσάμι και το φυστικάλευρο είναι ακόμη υψηλότερη (πάνω από 40%). Μπορεί να διαπιστωθεί ότι το λίπος που περιέχεται στα άλευρα από ελαιούχους σπόρους είναι πολύ χαμηλό, περίπου 10%. Τα απελαιωμένα άλευρα χρησιμοποιούνται συχνά ως συστατικά τροφίμων ή ως συμπληρώματα διατροφής, αλλά πιο συχνά ως συστατικά ζωοτροφής. Επιπλέον, οι πίτες ελαιούχων σπόρων είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα. Έχει διαπιστωθεί ότι η λυσίνη και η μεθειονίνη περιέχονται σε μικρή αναλογία στους ελαιούχους σπόρους. Αντίθετα, το σογιάλευρο με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αναφέρθηκε ότι είχε καλή αναλογία αμινοξέων και ήταν πλούσιο σε λυσίνη και επαρκή ποσότητα μεθειονίνης (Arrutia et al., 2020). Εκτός από τα θρεπτικά χαρακτηριστικά των αλεύρων, οι πρωτεΐνες τους διαθέτουν καλές λειτουργικές ιδιότητες, οι οποίες θα βοηθήσουν στη χρήση τους για ανάπτυξη νέων

προϊόντων διατροφής, καθώς και ως πρόσθετα τροφίμων. Οι πίτες ελαιούχων σπόρων όπως από σόγια, λιναρόσπορο και σουσάμι εμφανίζουν καλή ικανότητα απορρόφησης νερού και λαδιού, ικανότητα αφρισμού, σταθερότητα αφρού, ικανότητα γαλακτωματοποίησης και σταθερότητα γαλακτώματος, καθώς έχει διαπιστωθεί και ότι η απομάκρυνση του λίπους από το άλευρο ελαιούχων σπόρων συμβάλλει στην βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους (Kaur et al., 2021, Rani and Badwaik, 2021). Συνεπώς, τα υψηλής διατροφικής αξίας άλευρα ελαιούχων σπόρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα συστατικά σε διάφορα τρόφιμα για την ενίσχυση της θρεπτικής και διατροφικής τους αξίας.

Εικόνα 2.7 Πίτες διαφόρων ελαιούχων σπόρων (Rani et al., 2021)

2.2.4.1 Εφαρμογές αλεύρων ελαιούχων σπόρων στην βιομηχανία τροφίμων

Τα άλευρα ελαιούχων σπόρων και οι πρωτεΐνες τους μπορούν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα προκειμένου να προσδώσουν επιθυμητή διατροφική αξία αλλά και λειτουργικές ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως λειτουργικά συστατικά σε διάφορα προϊόντα διατροφής, μεταξύ των οποίων υποκατάστατα κρέατος, ροφήματα, αρτοσκευάσματα και ζυμαρικά.

Καθώς ο πληθυσμός αυξάνεται, η παγκόσμια ζήτηση για τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, όπως το κρέας, αυξάνεται σταδιακά. Ωστόσο, η υπερβολική κατανάλωση κρέατος έχει προκαλέσει όχι μόνο προβλήματα περιβαλλοντικής επιβάρυνσης και βιώσιμης ανάπτυξης, αλλά επηρεάζει επίσης την ευημερία των ζώων και την ανθρώπινη υγεία. Οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα, η περιβαλλοντική ρύπανση, η καταστροφή βιότοπων, η ανεξέλεγκτη βιομηχανία κρέατος που υποβάλλει τα ζώα σε δυσμενέστατες συνθήκες καθώς και οι επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου από την υπερκατανάλωση κρέατος παραμένουν μόνο λίγα σύγχρονα προβλήματα που καλείται να ασχοληθεί η επιστημονική κοινότητα, πάντα με την διατήρηση μιας ηθικής κατεύθυνσης αντάξιας του αιώνα που διανύεται.

Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, έχουν αναπτυχθεί φυτικά υποκατάστατα κρέατος, τα οποία παράλληλα προσφέρουν και μια νέα διατροφική επιλογή για τους χορτοφάγους. Στις μέρες μας τα φυτικά υποκατάστατα κρέατος αναπτύσσονται κυρίως με τη χρήση οσπρίων, όπως η σόγια. Πρωτεΐνη σόγιας χρησιμοποιείται ευρέως σε υποκατάστατα κρέατος λόγω των μοναδικών

λειτουργικών της ιδιοτήτων, όπως πηκτικότητα, συγκράτηση νερού και γαλακτωματοποίηση (Lan et al., 2020). Η πρωτεΐνη σόγιας παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που χρειάζεται το ανθρώπινο σώμα, ενώ συμβάλλει στη μείωση της χοληστερόλης και στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου καρδιαγγειακών και υπερλιπιδαιμικών παθήσεων. Ωστόσο, η θρεπτική αξία της πρωτεΐνης σόγιας περιορίζεται από τη σχετική της έλλειψη σε αμινοξέα που περιέχουν θείο, γεγονός που μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη εξωγενών πρωτεϊνών πλούσιων σε μεθειονίνη (Krishnan, 2005). Επίσης, παρά τις σημαντικές δυνατότητες της πρωτεΐνης σόγιας στην παρασκευή φυτικών υποκατάστατων κρέατος, η δημιουργία ενός προϊόντος με χαμηλή αλλεργιογόνο δράση, που να πλησιάζει τη γεύση του κρέατος και να απαλλάσσεται από την χαρακτηριστική οσμή, παραμένει σημαντική πρόκληση για το μέλλον.

Πέρα από τη σόγια, και άλλες πρωτεΐνες ελαιούχων σπόρων μπορούν να προστεθούν σε προϊόντα κρέατος για να αντικαταστήσουν εν μέρει τις ζωικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, μίγματα ναπίνης (κλάσμα πρωτεΐνης που περιέχετια στην ελαιοκράμβη) και καζεΐνης μπορούν να αντικαταστήσουν την καθαρή καζεΐνη σε λουκάνικα ή σάλτσες (Schwartz et al., 2015). Η προσθήκη πρωτεΐνης ελαιοκράμβης σε λουκάνικα βελτίωσε την υφή, το άρωμα και τη γεύση τους (Yoshie-Stark et al., 2006). (Rehrah et al. 2009) Παράλληλα το φυτικό υποκατάστατο κρέατος από φιστίκι παρουσίασε καλές φυσικοχημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες, συγκρίσιμες ή και καλύτερες από εκείνες των προϊόντων με βάση τη σόγια.

Εκτός από τα υποκατάστατα κρέατος, παρατηρείται σταδιακή αύξηση της χρήσης των πρωτεϊνών αλεύρων ελαιούχων σπόρων ως εναλλακτικές λύσεις έναντι του γάλακτος σε παγκόσμιο επίπεδο, παράλληλα με την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού σχετικά με τα οφέλη για την υγεία (Kaczmarska et al., 2018). Το γάλα αποτελεί ένα από τα πλέον ευρέως καταναλισκόμενα συμπληρώματα πρωτεΐνης. Ωστόσο, η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων παραμένει αντικείμενο επιστημονικής συζήτησης, καθώς έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου. Επιπλέον, ορισμένα άτομα παρουσιάζουν αλλεργία σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες του γάλακτος ή εμφανίζουν συμπτώματα δυσανεξίας στην λακτόζη. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στη Νοτιοανατολική Ασία, όπου η επίπτωση της αλλεργίας στις πρωτεΐνες του γάλακτος κατά τον πρώτο χρόνο ζωής ξεπερνά το 90% (Scholz-Ahrens et al., 2020). Συνεπώς, τα φυτικά υποκατάστατα γάλακτος έχουν προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Το γάλα σόγιας αποτελεί το πιο διαδεδομένο προϊόν σόγιας και ένα δημοφιλές φυτικό υποκατάστατο του ζωικού γάλακτος. (Xu et al. 2010)-Nedele et al. 2021) Μελέτες έχουν αναδείξει πιθανά οφέλη του γάλακτος από σόγια για την υγεία, όπως η μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και πρόωρης γήρανσης. Παράλληλα, το φυτικό υποκατάστατο γάλακτος από φυστίκι αποτελεί ακόμια μία εναλλακτική. Σχετικά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος φυστικιού και γάλακτος σόγιας, το γάλα φυστικιού ήταν το πιο δημοφιλές στους καταναλωτές και εμφάνιζε μεγαλύτερη ομοιότητα με τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός φυτικού γάλακτος. Συγκριτικά με το αγελαδινό γάλα και το γιαούρτι του, το γάλα φυστικιού και το γιαούρτι του παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνη, καθώς και υψηλότερες βαθμολογίες σε χρώμα, υφή και σύσταση, υποδεικνύοντας ότι αποτελούν καλές επιλογές για χορτοφάγους ως υποκατάστατα του αγελαδινού γάλακτος (Gamli & Atasoy, 2018).

Πέραν της χρήσης τους ως υποκατάστατα γάλακτος, οι πρωτεΐνες ελαιούχων σπόρων μπορούν να προστεθούν και σε άλλα τρόφιμα, όπως ροφήματα πρωτεΐνης, στιγμιαία ξηρά σέικ, και γαλακτοκομικά προϊόντα για παιδιά ηλικίας 1 έως 3 ετών (Chmielewska et al., 2021). Τα πιθανά οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση ροφημάτων που περιέχουν σπόρους chia αποτελούν αντικείμενο εκτενούς έρευνας. Παράλληλα, διεξάγονται ενδελεχείς μελέτες και σε άλλους ελαιούχους σπόρους για τη δυνητική τους χρήση σε ροφήματα.

Ελαιούχοι σπόροι βρίσκουν εφαρμογές και στον τομέα της αρτοποιίας. Τα προϊόντα αρτοποιίας αποτελούν βασικά είδη διατροφής, ευρέως διαδεδομένα που καταναλώνονται σε ολόκληρο τον κόσμο. Περιλαμβάνουν μια ποικιλία προϊόντων με βάση το αλεύρι, που ψήνονται σε φούρνο, όπως το ψωμί, τα μπισκότα, τα κέικ και τα γλυκίσματα. Οι πρωτεΐνες του σίτου διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη δημιουργία του απαιτούμενου ιξωδοελαστικού πλέγματος για την κατακράτηση του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη ζύμωση του ψωμιού (Pico et al., 2019). Παρόλα αυτά, η κατανάλωση γλουτένης μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη βλάβη του εντερικού βλεννογόνου, γνωστή ως κοιλιοκάκη, μια αυτοάνοση νόσος (Di Cairano et al., 2018). Έτσι, η βιομηχανία τροφίμων καλείται να αντιμετωπίσει την πρόκληση της βελτίωσης των συνθέσεων άλευρου και της ανάπτυξης προϊόντων αρτοποιίας χωρίς γλουτένη. Πολλοί ελαιούχοι σπόροι έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό τον σκοπό. Οι σπόροι chia, ως νέα εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης χωρίς γλουτένη, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς έρευνας για την ανάπτυξη συνταγών ψωμιού χωρίς γλουτένη. Πολλοί ερευνητές ανέπτυξαν ψωμί χωρίς γλουτένη με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων αλεύρου από σπόρους chia και διαπίστωσαν ότι η προσθήκη chia βελτίωσε την διατροφική αξία του προϊόντος. Επιπλέον, τα συστατικά των σπόρων chia μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα συστατικά, προσομοιώνοντας το πλέγμα γλουτένης και ενισχύοντας την ιξωδοελαστικότητα της ζύμης, οδηγώντας σε μεγαλύτερο όγκο ψωμιού (da Costa Borges et al., 2021).

Εκτός από τον σπόρο chia, και η ελαιοκράμβη έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη τροφίμων χωρίς γλουτένη. (Salah et al. 2019) Η προσθήκη πρωτεΐνης από ελαιοκράμβη σε ψωμί χωρίς γλουτένη παρασκευασμένο από αλεύρι λευκού ρυζιού, βελτίωσε τη λειτουργικότητα της ζύμης, τη διατροφική αξία και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. (Wanasundara et al. 2016) Επίσης η πρωτεΐνη από κράμβη μπορεί να αντικαταστήσει επιτυχώς τη γλουτένη του σίτου σε προϊόντα αρτοποιίας. Η ενσωμάτωση της πρωτεΐνης αυτής σε συνταγές ψωμιού χωρίς γλουτένη αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και καθυστέρησε αποτελεσματικά τη γήρανση του ψωμιού κατά την αποθήκευση, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη ελαιοκράμβης μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο συστατικό για το ψωμί χωρίς γλουτένη (Korus et al., 2021).

Υπάρχοι και άλλοι σπόροι, οι πρωτεϊνες των οποίων έχουν βρει εφαρμογή στην αρτοποιία. Η προσθήκη ελαιούχων αλεύρων, ειδικά 10% σκόνης από πίτουρο σησαμιού, σε αλεύρι σίτου μπορεί να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και το διατροφικό προφίλ των muffins, χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος (Kaur et al., 2022). Άλλοι ελαιούχοι σπόροι όπως η σόγια (Silva et al., 2018, Taghdir et al., 2017), το φιστίκι (Adeboye et al., 2018, Mridula et al., 2016) και το σουσάμι (Martinez et al., 2021, Robles-Ramírez et al., 2020), έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή ψωμιού χωρίς γλουτένη ή άλλων προϊόντων αρτοποιίας. Οι ελαιούχοι αυτοί σπόροι βελτίωσαν τη γεύση, την υφή και τη διατροφική

αξία των τελικών προϊόντων, αναδεικνύοντας τις δυνατότητες δημιουργίας πιο υγιεινών επιλογών για καταναλωτές με διατροφικούς περιορισμούς.

2.2.5 Το βαμβάκι ως ελαιούχος σπόρος

Ο βαμβακόσπορος αποτελεί μια βιώσιμη πηγή φυτικής πρωτεΐνης, με παγκόσμια παραγωγή που αγγίζει τους ~10 εκατομμύρια τόνους πρωτεΐνης. Η ποσότητα αυτή μπορεί δυνητικά να καλύψει τις ετήσιες ανάγκες πρωτεΐνης για περισσότερους από μισό δισεκατομμύριο ανθρώπους παγκοσμίως. Οι λειτουργικές του ιδιότητες έχουν αναδείξει την πρωτεΐνη βαμβακόσπορου ως μια υποσχόμενη επιλογή για την καταπολέμηση του υποσιτισμού στις ασιατικές και αφρικανικές ηπείρους. Η παγκόσμια παραγωγή βαμβακόσπορου για το έτος 2019/2020 εκτιμάται σε περίπου 44,84 εκατομμύρια τόνους (Statista, 2020). Οι βαμβακόσποροι περιέχουν 17–22% έλαιο και, μετά την εξαγωγή του, το παραπροϊόν που λαμβάνεται είναι η πίτα βαμβακόσπορου (Hernandez, 2016). Το άλευρο της έχει τη δυνατότητα να αποδώσει ~10 εκατομμύρια τόνους πρωτεΐνης, ικανούς να καλύψουν τις ετήσιες ανάγκες πρωτεΐνης περισσότερων από 500 εκατομμυρίων ανθρώπων (Wedegaertner & Rathore, 2015). Η πρωτεϊνική σύσταση του άλευρου αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες διαλυτές σε άλατα (σφαιρίνες: 33–63,7%), ακολουθούμενες από διαλυτές σε νερό (αλβουμίνες: 20,8–32,2%) και διαλυτές σε αλκαλικό περιβάλλον (γλουτελίνες: 9,2–28%) (Balandrán-Quintana et al., 2019). Σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση, οι περισσότερες αφρικανικές και ασιατικές χώρες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά υποσιτισμού και κατατάσσονται στις θέσεις 90–119 του Παγκόσμιου Δείκτη Πείνας του 2018 (Rathore et al., 2020). Ταυτόχρονα, οι ίδιες χώρες είναι από τους μεγαλύτερους παραγωγούς βαμβακόσπορου παγκοσμίως, με παραγωγή που ξεπερνά τους 1000 τόνους ετησίως. Ως εκ τούτου, η επιτυχής και αποτελεσματική αξιοποίηση του βαμβακόσπορου ως πηγή πρωτεΐνης θα μπορούσε να αλλάξει τα δεδομένα στην άμβλυνση του υποσιτισμού στις χώρες που έχουν πληγεί περισσότερο.

Από την άλλη πλευρά, η παρουσία της γκοσυπόλης περιορίζει τη χρήση των βαμβακόσπορων τόσο ως ζωοτροφή όσο και ως συστατικό σε ανθρώπινη διατροφή. Η ουσία αυτή είναι μια τοξική πολυφαινολική ένωση που απαντάται σε ολόκληρο το φυτό βαμβακιού (Gossypium hirsutum), με τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή της (έως 2,4% σε ξηρά βάση) να εντοπίζεται στους βαμβακόσπορους. Η κατανάλωση της έχει αποδειχθεί ότι επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγική υγεία των ζώων (Zhang et al., 2006). Η συνεχής αύξηση του κόστους της πρωτεΐνης σόγιας καθώς και της ζωικής σε χώρες της Ασίας και της Αφρικής καθιστά την βαμβακόπιτα πιο ανταγωνιστική και βιώσιμη πηγή πρωτεΐνης για τη διατροφή του ανθρώπου. Η αξιοποίηση αυτής της πρωτεΐνης είναι εφικτή εφόσον μειωθεί η περιεκτικότητα της γκοσυπόλης σε ασφαλή επίπεδα. Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (USFDA) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχουν θέσει ως ανώτατο ασφαλές όριο την περιεκτικότητα 450 ppm σε ελεύθερη γκοσυπόλη για προϊόντα πρωτεΐνης που προορίζονται για μη μηρυκαστικά ζώα. Αρχικά, η απομάκρυνση της γκοσυπόλης επιχειρήθηκε μέσω παραδοσιακών φυσικών μεθόδων, όπως η θερμική επεξεργασία, η πίεση και η χρήση υγρών κυκλώνων. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές κρίθηκαν μη βιώσιμες λόγω του υψηλού κόστους επεξεργασίας (Rathore et al., 2020). Πιο σύγχρονες φυσικές διεργασίες περιλαμβάνουν την ακτινοβολία γάμμα και ηλεκτρονίων, οι οποίες έχουν δείξει αποτελεσματικότητα στη μείωση τόσο της ελεύθερης όσο και της συνολικής γοσσιπόλης με εξάρτηση από τη δόση.

Παράλληλα, εργαλεία μοριακής βιολογίας έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση της γοσσιπόλης στους βαμβακόσπορους. Ερευνητές του Texas A&M University κατάφεραν να επιτύχουν εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις γκοσυπόλης στους σπόρους με τη βοήθεια γενετικής τροποποίησης (Rathore et al., 2020). Ωστόσο, η χρήση γενετικά τροποποιημένων προϊόντων αντιμετωπίζει ρυθμιστικά εμπόδια σχεδόν σε όλες τις χώρες, ειδικά ως προς την ασφάλεια για το περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο. Οι χημικές μέθοδοι αφαίρεσης της γκοσυπόλης κρίνονται περισσότερο εφικτές για τη χρήση ως ζωοτροφή μη μηρυκαστικών και ως συμπλήρωμα σε ανθρώπινη διατροφή. Η εφαρμογή τεχνικών με χρήση διαλυτών μείωσε αποτελεσματικά τα επίπεδα γκοσυπόλης, καθιστώντας το κατάλληλο ως τροφή για ιχθυοκαλλιέργειες, πτηνοτροφεία και χοιροστάσια (Rathore et al., 2020).

2.2.5.1 **Παραπροϊόντα σύνθλιψης βαμβακόσπορου**

Οι φυτικές πρωτεΐνες αποκτούν όλο και μεγαλύτερη σημασία λόγω της ανανεώσιμης και βιώσιμης φύσης τους. (Kumar et al. 2021a) Έχουν μελετηθεί διάφορες μέθοδοι εξαγωγής φυτικών πρωτεϊνών για πιθανή χρήση ως συμπλήρωμα διατροφής. Λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας, απαραίτητων λιπαρών οξέων και σακχάρων, ο βαμβακόσπορος θεωρείται «τριπλό θρεπτικό συστατικό». Έχει αναφερθεί ότι έχει πολλά οφέλη για την υγεία, όπως η επούλωση των ελκών του στομάχου, η πρόληψη του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, η ρύθμιση του εμμηνορροϊκού κύκλου, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η βελτίωση της νευρολογικής υγείας. Η χρήση πρωτεΐνης βαμβακόσπορου, είτε άμεσα είτε έμμεσα, αντί της ζωικής μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του προβλήματος του υποσιτισμού. Εκτός από τις εφαρμογές σε τρόφιμα, υπάρχουν πολλές εφαρμογές εκτός τροφίμων, όπως συσκευασίες (μεμβράνες και επικάλυψη) γεωργικών προϊόντων, κόλλες, βιοπλαστικά, εφαρμογές διεπιφάνειας και γαλακτωματοποίησης και υδρογέλες.

Η πίτα βαμβακόσπορου και οι απομονωμένες πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπτυξη διαφόρων προϊόντων τροφίμων και είναι ευρέως αποδεκτά ως θρεπτικά και λειτουργικά συστατικά σε προϊόντα κρέατος και αρτοποιίας (Zhuge et al., 1988). Στο παρελθόν έχουν διαπιστωθεί οι δυνατότητες της πρωτεΐνης βαμβακιού σε μια ποικιλία συστημάτων τροφίμων (Cater et al. (1977). Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι είχε χρησιμοποιηθεί στις ΗΠΑ ως πρόσθετο τροφίμων από τη δεκαετία του 1930. Λιγότερο από 5% απελαιωμένου άλευρου βαμβακιού προστέθηκε σε μπισκότα, ντόνατς και σοκολατένιες καραμέλες λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και όχι των θρεπτικών χαρακτηριστικών. Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 και του 1960 ένα χαμηλού κόστους και εξαιρετικά θρεπτικό προϊόν διατροφής, μείγμα λαχανικών, που ονομάζεται INCAP ή «Incaparina» ήταν δημοφιλές στη Γουατεμάλα και την Κολομβία, χρησιμοποιώντας 2 εκατομμύρια λίβρες βαμβακόσπορου για την παραγωγή του το 1964 (Spadaro et al. 1979, Cater et al. 1977).

Εικόνα 2.8 Προϊόν «Incaparina»

Έχουν εξεταστεί πολυάριθμες εφαρμογές της συμπυκνωμένης πρωτεϊνης σε τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων προϊόντων κρέατος (όπως μπιφτέκια βοδινού, κεφτεδάκια και φρέσκα λουκάνικα) καιπροϊόντων τύπου δημητριακών και αρτοσκευασμάτων (όπως μπισκότα, ντόνατς, κέικ και ψωμιά) (Spadaro et al. 1979). (De Buckle et al. 1979) Τα άλευρα βαμβακόσπορου μπορούν, επίσης, να επεξεργαστούν με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του αλευριού σόγιας, μειώνοντας ταυτόχρονα την περιεκτικότητα σε ελεύθερη γοσσυπόλη σε ασφαλή επίπεδα. Οι ίδιοι συγγραφείς παρήγαγαν επίσης ένα τελικό υλικό με 90% πρωτεΐνη, το οποίο είχε λευκό κρεμώδες χρώμα και μια ήπια γεύση. (Zhuge et al. 1988). Αρκετές μελέτες που χρησιμοποίησαν πρωτεΐνη βαμβακόσπορου κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτές οι πρωτεΐνες βοηθούν στη βελτίωση της υγείας υποσιτισμένων παιδιών και ενήλικων γυναικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Τεχνολογίες εκχύλισης

Η εκχύλιση αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο παραλαβής χημικών ουσιών από στερεή ή υγρή πρώτη ύλη, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει κάποια διαφορετική φυσική ή χημική ιδιότητα ανάμεσα στο ανακτώμενο συστατικό και τα άλλα συνυπάρχοντα στο δείγμα συστατικά. Για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου κατά την εκχύλιση, δίνεται έμφαση εκτός των άλλων και στην απόδοση της κάθε μιας από αυτές, καθώς και την καθαρότητα και την σταθερότητα των παραλαμβανόμενων συστατικών.

Οι διεργασίες εκχύλισης διαχωρίζονται με βάση την φύση της πρώτης ύλης και του διαλύτη, από τον οποίο θα δεσμευθεί. Ειδικότερα διακρίνονται εκχυλίσεις υγρού-υγρού, στερεού-υγρού (ή αλλιώς έκπλυση), στερεού-αερίου κλπ, με την πρώτη ύλη και τον διαλύτη να βρίσκονται στην αντίστοιχη φυσική κατάσταση της ύλης.

Η εκχύλιση οργανικών ουσιών από στερεά αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Για το λόγο αυτό προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης, συνήθως εφαρμόζονται για την παραλαβή πρωτεϊνών από παραπροϊόντα της βιομηχανίας ελαιούχων σπόρων. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εκχύλισης είναι η συμβατική

εκχύλιση, η εκχύλιση Soxhlet, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, η συνδυαστική εφαρμογή μικροκυμάτων και υπερήχων στην διεργασία της εκχύλισης, η ενζυμική εκχύλιση καθώς και η εκχύλιση υγρού υπό πίεση.

3.1 Συμβατική εκχύλιση

Η πιο απλή μέθοδος εκχύλισης περιλαμβάνει την επαφή και ανάδευση της στερεής ουσίας με τον κατάλληλο διαλύτη και την παραλαβή στην συνέχεια του ολικού εκχυλίσματος με φυγοκέντρηση και απόχυση ή διήθηση. Εναλλακτικά μπορεί η ανάδευση να αποφευχθεί και το μίγμα της στερεής ουσίας με τον διαλύτη να παραμείνει πωματισμένο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ή να προτιμηθεί η ανακίνηση του περιέκτη της εκχύλισης. Γενικότερα η ανάδευση του μίγματος που εκχυλίζεται επιταχύνει την διαδικασία και ευνοεί την διάχυση των εκχυλισμένων συστατικών, καθώς εξασφαλίζει την καλύτερη διασπορά του υλικού στον διαλύτη. Άλλη παράμετρος που διέπει την συμβατική μέθοδο εκχύλισης είναι η θέρμανση. Συνήθως χρησιμοποιείται, για να επιταχύνει και να υποβοηθήσει την διεργασία, η οποία θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλές τιμές θερμοκρασίας στην περίπτωση εκχύλισης θερμοευαίσθητων ενώσεων. Ανάλογα με την επιθυμητή απόδοση της διαδικασίας, διαφοροποιείται και ο χρόνος της εκχύλισης, ο οποίος μπορεί να κυμαίνεται από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη.

Βασικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας αυτής αποτελεί το γεγονός ότι είναι μία απλή και γρήγορη μέθοδος, ευέλικτη ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα, που εφαρμόζεται τόσο σε δείγματα με μικρές όσο και σε δείγματα με μεγάλες συγκεντρώσεις μίας ουσίας. Επίσης το αρχικό κόστος της τεχνικής αυτής είναι μικρό, καθώς δεν υπάρχει ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος εκχύλισης παρουσιάζει και ορισμένα αποτρεπτικά στοιχεία όσον αφορά την εφαρμογή του στην βιομηχανία. Ορισμένα από αυτά είναι η ανάγκη για μεγάλη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, με το επακόλουθο κόστος καθαρισμού και συμπύκνωσης, η πιθανή αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες και η σταδιακή μείωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας όσο ο διαλύτης εμπλουτίζεται με την εκχυλισμένη ουσία.

3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

Μια καινοτόμο και περιβαλλοντικά βιώσιμη εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης αποτελεί η εκχύλιση με την χρήση υπερήχων, μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς σε διάφορες διεργασίες χημικών βιομηχανιών και της βιομηχανίας τροφίμων. Οι υπέρηχοι είναι μία μορφή ενέργειας που μεταδίδεται ως κύματα και έχουν κατώτερο όριο συχνότητας συνήθως τα 20 kHz. Θεωρούνται γενικότερα ασφαλείς και μη τοξικοί, σε αντίθεση με τα μικροκύματα, τα οποία αντιμετωπίζονται συχνά με καχυποψία από το γενικό πληθυσμό (Καλτσά, 2015). Οι εξελίξεις στην τεχνολογία των υπερήχων και τα πιθανά οφέλη από τη χρήση τους κατά την εκχύλιση, έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους σε ένα ευρύτερο φάσμα των χημικών διεργασιών.

Ο μηχανισμός που ελέγχει την μέθοδο αυτή αποδίδεται σε μηχανικές και θερμικές επιδράσεις που καταλήγουν στη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και στην ενισχυμένη μεταφορά μάζας μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Δύο είναι τα βασικά

φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την επίδραση των υπερήχων σε ένα διάλυμα κατά την εκχύλιση, η μεταβολή της πίεσης και η μεταβολή της θερμοκρασίας. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης.

Οι υπέρηχοι μεταφέρουν πίεση κατά την διέλευση τους σε ένα μέσο, με αποτέλεσμα την δημιουργία περιοχών χαμηλής και υψηλής πίεσης. Η διακύμανση αυτή της πίεσης δημιουργεί κύκλους διαστολής και συμπίεσης και είναι ανάλογη της ποσότητας ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα. Όταν οι διακυμάνσεις πίεσης στο υγρό είναι αρκετά υψηλές (3.000 MPa), τότε δημιουργούνται στο υγρό μέσο κοιλότητες ή μικροφυσαλίδες αερίου ή ατμού. Οι σχηματιζόμενες αυτές φυσαλίδες, απορροφούν την ενέργεια από τα ηχητικά κύματα και αναπτύσσονται κατά την διάρκεια των κύκλων διαστολής, ενώ επανασυμπιέζονται κατά τον κύκλο της συμπίεσης. Η συνεχής επανάληψη αυτών των κύκλων επιφέρει αλλαγές στη δομή του μέσου που υφίσταται την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων. Όταν το μέγεθος αυτών των φυσαλίδων φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, αυτές καταρρέουν κατά τη διάρκεια ενός κύκλου συμπίεσης εξαιτίας της επαναλαμβανόμενης σπηλαίωσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μεταβατικό σημείο. Το φαινόμενο αυτό που αναφέρεται στο σχηματισμό, την ανάπτυξη και την κατάρρευσή των φυσαλίδων κατά τη διάρκεια διάδοσης ενός υπερηχητικού κύματος σε ένα υγρό μέσο, είναι γνωστό ως ακουστική σπηλαίωση. Σε καθαρά υγρά, η φυσαλίδα που δημιουργείται κατά την σπηλαίωση, διατηρεί το σφαιρικό της σχήμα κατά τη διάρκεια της κατάρρευσης, καθώς το περιβάλλον της είναι ομοιόμορφο. Ωστόσο, όταν η φυσαλίδα καταρρέει κοντά σε μια στερεή επιφάνεια, όπως γίνεται κατά την εκχύλιση ενός στερεού, δημιουργείται ασυμμετρία και πραγματοποιούνται διάφορες φυσικές επιδράσεις. Έτσι προκαλείται μακρο-στροβιλισμός, συγκρούσεις υψηλής ταχύτητας μεταξύ των σωματιδίων και διαταραχή σε μικροπορώδη σωματίδια της βιομάζας, φαινόμενα που επιταχύνουν την εσωτερική διάχυση. Αυτές οι δέσμες διαλύτη που παράγονται προς τα κυτταρικά τοιχώματα από την κατάρρευση της φυσαλίδας, επιδρούν έντονα στην στερεή επιφάνεια του δείγματος, αυξάνοντας τη διείσδυση του διαλύτη μέσα στο κύτταρο καθώς και την επιφάνεια επαφής μεταξύ στερεής και υγρής φάσης. Από αυτούς τους παράγοντες προκύπτει μια αυξημένη μεταφορά μάζας λόγω της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων και της διάβρωσης της επιφάνειας τους. Ως αποτέλεσμα, η κατάρρευση των φυσαλίδων που πλήττει την επιφάνεια της στερεάς δομής και διασπά τα κύτταρα, προκαλεί την απελευθέρωση και εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών.

Γενικά, η εκχύλιση με υπερήχους έναντι της συμβατικής πλεονεκτεί σε πολλές παραμέτρους. Προσφέρει μεγαλύτερες αποδόσεις και καθαρότητα του ανακτώμενου συστατικού σε μικρότερα χρονικά διαστήματα και με κατανάλωση μικρότερων όγκων διαλύτη. Επίσης έχει μειωμένο κόστος επεξεργασίας και μικρό μέγεθος εξοπλισμού, καθώς είναι και περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική τεχνική. Από την άλλη πλευρά, η συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης διαθέτει και μειονεκτήματα. Η υψηλή ισχύς υπερήχων μπορεί να αλλοιώσει την δομή του ανακτώμενου υλικού και να υποβαθμίσει την ποιότητα του. Έτσι είναι σημαντική η εκτεταμένη μελέτη των ιδιοτήτων του προϊόντος. Επίσης η εκχύλιση με χρήση υπερήχων εμφανίζει περιορισμένη κλιμάκωση σε βιομηχανικό επίπεδο. Παρόλο που είναι εύκολα υλοποιήσιμη σε εργαστηριακή κλίμακα, η ομοιόμορφη εφαρμογή υπερήχων σε μεγαλύτερους όγκους είναι τεχνικά δύσκολη.

3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση μικροκυμάτων σε εκχυλίσεις παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και προοπτικές. Η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση αποτελεί μία νέα τεχνική εκχύλισης, που συνδυάζει τα μικροκύματα με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης, επιφέροντας αποδόσεις αντίστοιχες με αυτές των συμβατικών μεθόδων σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα.

Η βασική αρχή λειτουργίας της έγκειται στο γεγονός ότι προκαλούνται μεταβολές στη κυτταρική δομή του στερεού δείγματος από ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Τα μικροκύματα είναι μη ιονισμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας μεταξύ 300 MHz έως 300 GHz και μήκους κύματος 10^{-3}-1.0 m, ενώ στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα τοποθετούνται μεταξύ των ακτινών Χ και της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η ενέργεια που μεταφέρουν τα μικροκύματα, καθώς διέρχονται από ένα υλικό, μετατρέπεται σε θερμότητα, λόγω της ιονικής αγωγής και της διπολικής περιστροφής των μορίων του διαλύματος. Η πρώτη παράγει θερμότητα λόγω της αντίστασης που δημιουργείται στο διάλυμα από την κίνηση των ιόντων που περιέχει και συνεπώς είναι άμεση συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και του μεγέθους και του φορτίου των ιόντων του. Η διπολική περιστροφή σχετίζεται με τις κινήσεις των δίπολων μορίων του διαλύματος λόγω της προσπάθειάς τους να ευθυγραμμιστούν με τη φορά του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, που έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτατη αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος λόγω των περιστροφών και των συγκρούσεων που λαμβάνουν χώρα. Έτσι κατά τη χρήση αυτής της μεθόδου, η ενέργεια που μεταφέρουν τα μικροκύματα μετατρέπεται σε επιλεκτική θέρμανση στα απορροφητικά τμήματα του φυτικού υλικού, με αποτέλεσμα ο όγκος των κυττάρων και ο ρυθμός διάχυσης να αυξάνονται.

Η θερμότητα που παράγεται στο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την εξάτμιση της εσωτερικής υγρασίας που περιέχεται στα κύτταρα του δείγματος που εκχυλίζεται και την ανάπτυξη υψηλής πίεσης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Η αύξηση αυτή της πίεσης, μεταβάλλει τις φυσικές ιδιότητες των ιστών και αυξάνει το πορώδες του βιολογικού υλικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διείσδυση του διαλύτη στο στερεό και την ευκολότερη και ταχύτερη ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών από το δείγμα (Μισυρλή, 2015).

Ένα βασικό σημείο διαφοροποίησης αυτής της τεχνικής είναι ότι στις περισσότερες μεθόδους εκχύλισης κατά την θέρμανση ένα μεγάλο ποσό θερμότητας χάνεται στο περιβάλλον, σε αντίθεση με τα μικροκύματα, όπου η θέρμανση μεταδίδεται αποκλειστικά στο εκχυλιζόμενο διάλυμα χωρίς απώλειες. Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα κατά την εκχύλιση μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα, ενώ στην περίπτωση των μικροκυμάτων η θέρμανση ξεκινάει κατευθείαν από το δείγμα, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Έτσι με τη χρήση αυτής της τεχνικής, η θέρμανση πραγματοποιείται εκλεκτικά στην ύλη που προορίζεται για εκχύλιση και μεταβαίνει κατευθείαν σε αυτήν, καθώς ο περιέκτης δεν απορροφά θερμότητα, με αποτέλεσμα πρακτικά να μην χάνεται θερμότητα στο περιβάλλον, καθώς το σύστημα είναι κλειστό.

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση από μικροκύματα είναι μία ταχεία μέθοδος εκχύλισης που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη συγκεκριμένη μέθοδο έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση

με άλλες τεχνικές. Προσφέρει εκχυλίσματα υψηλότερης καθαρότητας και απόδοσης σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές σε σημαντικά μειωμένο χρόνο. Επίσης συνοδεύετεται από λιγότερο κόστος για την πραγματοποίηση της εκχύλισης λόγω των μειωμένων απαιτήσεων σε ενέργεια, γεγονός που αυξάνει και την περιβαλλοντική της βιωσιμότητα.

Η εκχύλιση με μικροκύματα, ωστόσο, διαθέτει και μειονεκτήματα. Σε περιπτώσεις που ο διαλύτης ή/και οι επιθυμητές εκχυλιζόμενες ενώσεις είναι πτητικές, παρατηρείται μειωμένη αποτελεσματικότητα και απόδοση της διεργασίας. Επίσης, για θερμοευαίσθητα βιοδραστικά συστατικά, η χρήση υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την βιοαποικοδόμησή τους, λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας που αναπτύσσεται (Μισυρλή, 2015).

3.4 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση

Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση αποτελεί μια καινοτόμο τεχνολογία εκχύλισης, η οποία αξιοποιεί πίεση της τάξης των 100–600 MPa. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ισοστατική εφαρμογή της πίεσης σε δείγμα τοποθετημένο μέσα σε υγρό μέσο (συνήθως τον διαλύτη), εντός θαλάμου υψηλής πίεσης. Η ομοιόμορφη πίεση προκαλεί διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών, αυξάνοντας τη διαπερατότητά τους και διευκολύνοντας την έξοδο των ενδοκυτταρικών μακρομορίων, χωρίς την ανάγκη χρήσης ισχυρών χημικών μέσων. Παράλληλα μέσω αυτής της μεθόδου δύναται να πραγματοποιούνται εκχυλίσεις σε υψηλές θερμοκρασίες και να μην εξατμίζεται ο διαλύτης, γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση της απόδοσης της διεργασίας με την αύξηση της διαλυτότητας (Mustafa et al., 2011).

Η συγκεκριμένη τεχνολογία εκχύλισης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, αποτελεί μια βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο χωρίς να χαρακτηρίζεται από το κόστος συμβατικών και ενεργειακά ασύμφορων τεχνικών καθώς επίσης και η χρήση μόνο νερού ή ήπιων διαλυτών ελαχιστοποιεί τον σχηματισμό τοξικών καταλοίπων. Παράλληλα, όπως αναφέρθηκε, βελτιώνεται η διαλυτότητα και η εκχυλιστική απόδοση, καθώς η υψηλή πίεση μεταβάλλει τη δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση της προσβασιμότητας και η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει την διαλυτότητα. Συνεπώς προσφέρεται μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης.

Στον αντίποδα διακατέχεται και από ορισμένα εμπόδια. Το κόστος εξοπλισμού της μεθόδου παραμένει υψηλό, καθώς υπάρχει η ανάγκη για ειδικούς θαλάμους υψηλής πίεσης και ανθεκτικά υλικά. Επιπλέον εμφανίζονται περιορισμοί στην κλίμακα παραγωγής. Παρότι η μέθοδος έχει περάσει σε πιλοτικά και βιομηχανικά επίπεδα, παραμένουν προκλήσεις στην πλήρη κλιμάκωση για συνεχείς ροές. Τέλος, δύνανται να παρουσιαστούν δομικές μεταβολές στις πρωτεΐνες. Αν και συνήθως θετικές, οι αλλαγές αυτές μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να επηρεάσουν αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα ή την αλλεργιογόνο δράση, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται επηρεάζουν τις τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών. Η εμπεριστατωμένη μελέτη των ιδιοτήτων των παραλαβούμενων πρωτεϊνών καθίσταται επιτακτική.

3.5 Ενζυμική εκχύλιση

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες με ισχυρή καταλυτική δραστικότητα. Συντίθενται από βιολογικά κύτταρα και σε όλους τους οργανισμούς συμμετέχουν στις σχετικές με το μεταβολισμό χημικές αντιδράσεις.

Έτσι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα επίσης σε πολλά τρόφιμα και με αυτό τον τρόπο βελτιώνουν ή υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμο βασίζεται στην εγγενή ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν τις αντιδράσεις με εξαιρετική εξειδίκευση, τοπική εκλεκτικότητα και ικανότητα να λειτουργούν υπό ήπιες συνθήκες επεξεργασίας. Οι ενζυμικές εκχυλίσεις, λόγω της αυξημένης ανάγκης για τεχνικές φιλικές προς το περιβάλλον, έχουν τραβήξει την προσοχή των ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Παρόλο που υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με τα ένζυμα, η πρακτική εφαρμογή τους στην βιομηχανία υστερεί. Αυτή η μέθοδος λειτουργεί ως μέτρο πίεσης στην παγκόσμια βιομηχανία για τον εντοπισμό οικολογικού τρόπου εκχύλισης νέων ενώσεων (Gómez-García, Martínez-Ávila, & Aguilar, 2012; Pinelo, Arnous, & Meyer, 2006)

Μία ιδιαίτερα χρήσιμη εφαρμογή των ενζύμων βασίζεται στην ιδιότητά τους να αυξάνουν την επίδραση της εκχύλισης στην πρώτη ύλη, με αποτέλεσμα είτε να μειώνεται η ποσότητα διαλύτη που απαιτείται για εκχύλιση είτε να αυξάνεται η ποσότητα των παραγόμενων από την εκχύλιση ενώσεων. Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη απελευθέρωση και αποτελεσματικότερη εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών. Ένζυμα όπως οι πηκτινάσες, οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην επεξεργασία χυμού και την παραγωγή μπύρας, για την αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τη βελτίωση της εκχυλίσεως του χυμού. Επιπροσθέτως η διάσπαση της μήτρας κυτταρικού τοιχώματος απελευθερώνει συστατικά όπως οι φαινολικές ενώσεις στο χυμό, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα του προϊόντος. Οι εκχυλίσεις με βάση το ένζυμο αποτελούν αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας και έχουν τη δυνατότητα να είναι εμπορικά ελκυστικές (Puri, Sharma, & Barrow, 2012).

Τα ένζυμα, όταν χρησιμοποιούνται για την διενέργεια των εκχυλίσεων, δεν είναι οι μόνοι παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που παίζουν ρόλο σε αυτού του τύπου τις διεργασίες, όπως η ποσότητα πρώτης ύλης και ενζύμου, ο χρόνος επώασης, το pH και η θερμοκρασία. Η αναλογία πρώτης ύλης/ενζύμου παίζει σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση, καθώς πολύ υψηλές ποσότητες ενζύμου δρουν αποτρεπικά στην διεργασία, ενώ μικρές δύναται να μην επηρεάσουν καθόλου την απόδοση. Πρέπει επίσης να ανιχνευθεί και να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο ένζυμο για την κάθε περίπτωση, ώστε να είναι συμβατό με την πρώτη ύλη, να διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες και να ενισχύει την διαλυτοποίηση της επιθυμητής ουσίας στον διαλύτη. Η θερμοκρασία και το pH στην επώαση παίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς τα ένζυμα ως πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες ως προς αυτές τις παράμετρους και σε ακραίες τιμές τους μετουσιώνονται, με αποτέλεσμα να χάνουν την καταλυτική τους ικανότητα.

Η προεπεξεργασία με ένζυμο πριν την εισαγωγή του συστήματος στην επιλεγμένη εκχυλιστική μέθοδο αποτελεί πρακτική που δρα θετικά στην διαδικασία της εκχύλισης. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έχουν δείξει ότι οδηγεί συνήθως σε μείωση του χρόνου εκχύλισης, ελαχιστοποιεί τη χρήση των διαλυτών και παρέχει αυξημένη απόδοση και ποιότητα του προϊόντος. Η γνώση της σύνθεσης των κυτταρικών τοιχωμάτων των πρώτων υλών βοηθά στην επιλογή των κατάλληλων ενζύμων για την προκατεργασία. Η μειωμένη χρήση διαλυτών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης είναι ιδιαίτερα

σημαντική τόσο για ρυθμιστικούς όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους, παρέχοντας μια πιο «πράσινη» επιλογή από την συμβατική μη ενζυμική εκχύλιση.

Παρ' όλα αυτά, η ενζυμική εκχύλιση έχει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, το κόστος των ενζύμων είναι υψηλό για την επεξεργασία μεγάλων ποσοτήτων πρώτης ύλης, γεγονός που λειτουργεί αποτρεπτικά όσον αφορά την εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο. Ένα άλλο εμπόδιο για την βιομηχανική κλιμάκωση της ενζυμικής εκχύλισης είναι η διαφορετική δράση των ενζύμων ανάλογα τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το ποσοστό διαλυμένου οξυγόνου, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών (Puri et al., 2012).

3.6 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικές πηγές

Λαμβάνοντας υπόψιν την ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης και τα πλεονεκτήματα των φυτικών πρωτεϊνών, συμβατικές και καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης έχουν εφαρμοσθεί για την ανάκτηση υψηλής διατροφικής αξίας πρωτεϊνών από φυτικές πηγές. Μεγάλη σημασία έχει η απόδοση της διεργασίας και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος, αλλά και οι ιδιότητες των πρωτεϊνών που λαμβάνονται, καθώς ορισμένες μέθοδοι δύναται να αλλοιώσουν την φυσική τους δομή.

Ο πιο σημαντικός παράγοντας για την αξιοποίηση της φυτικής πρωτεΐνης είναι η χρήση κατάλληλης τεχνολογίας εκχύλισης με βάση τις φυτικές μήτρες. (Pojić et al., 2018) Έρευνες έχουν αναφερθεί σε διάφορες συμβατικές τεχνικές, όπως εκχύλιση με διαλύτη το νερό, με προσθήκη άλατος και αλκαλική εκχύλιση, αλλά και μη συμβατικές μεθόδους που μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν την κυτταρική διάσπαση, όπως με χρήση ενζύμων, μικροκυμάτων, υψηλής πίεσης και υπερήχων. Οι συμβατικές μέθοδοι αναφέρονται στις συνήθως χρησιμοποιούμενες τεχνικές που οδηγούν σε χαμηλότερες αποδόσεις λόγω της αποικοδόμησης πρωτεϊνών. Αυτή η μείωση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως ο χρόνος εκχύλισης, οι διαλύτες, το pH και η θερμοκρασία. Ως εκ τούτου, στις μέρες μας έχει δοθεί έμφαση και σε μη θερμικές εναλλακτικές τεχνολογίες για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης και τη μείωση της αποικοδόμησης πρωτεϊνών. Πολυάριθμες μελέτες υποδεικνύουν επίσης ότι η ταυτόχρονη χρήση τόσο συμβατικών όσο και μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης πρωτεϊνών προσφέρει υψηλότερες αποδόσεις (Görgüç et al., 2019).

3.6.1 Χημικές μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι ταξινομούνται με βάση τους διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται, όπως νερό και οργανικοί διαλύτες. Οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται επίσης σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους για τη βελτίωση της ανάκτησης πρωτεϊνών. Έτσι διαφορετικές χημικές μέθοδοι σχεδιάζονται για την απομόνωση πρωτεϊνών με βάση τη μέγιστη ανάκτηση και την ελάχιστη απώλεια. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου απομόνωσης πρωτεϊνών εξαρτάται κυρίως από τη φύση του δείγματος πρωτεΐνης (Lee, Show, Ling, Chang, 2017).

Η επεξεργασία του δείγματος για την εκχύλιση συνήθως πραγματοποιείται σε τρία βήματα και συγκεκριμένα, απομάκρυνση του λίπους, εκχύλιση και καταβύθιση της πρωτεΐνης. Στο πρώτο στάδιο, διαλύτες, όπως πετρελαϊκός αιθέρας, εξάνιο και πεντάνιο, χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των ενώσεων που δρουν αποτρεπτικά στην διεργασία. Έπειτα, σε υδατικές εκχυλίσεις

οι πρωτεΐνες εκχυλίζονται συχνά με προσθήκη ουσιών, όπως άλατα (π.χ. NaCl), ιοντικές αλλά και μη ιοντικές απορρυπαντικές ουσίες (π.χ. SDS και NP-40 αντίστοιχα). Σε εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες, συνήθως, γίνεται χρήση αλκοολών (π.χ. αιθανόλη) και ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. φαινόλη). Τέλος, η απομονωμένη πρωτεΐνη καταβυθίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο χρησιμοποιώντας ουσίες όπως θειικό αμμώνιο, ακετόνη, κιτρικό και υδροχλωρικό οξύ. Το ίζημα περιέχει πρωτεΐνη η οποία μπορεί να ανακτηθεί με φυγοκέντρηση. Εκτός από την πρωτεΐνη βέβαια, μεγάλος αριθμός μη πρωτεϊνικών ακαθαρσιών θα βρίσκονται επίσης στο ίζημα (Bose et al., 2019). Κατά την καταβύθιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά και συνδυασμός των παραπάνω ουσιών (Lee et al., 2017).

Οι οργανικοί διαλύτες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση, αλλά και στην καταβύθιση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες, που έχουν μη πολικές ή/και πολικές πλευρικές αλυσίδες και διαθέτουν αρωματικά αμινοξέα, είναι εύκολα διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες όπως αιθανόλη, βουτανόλη και ακετόνη (Qiaoyun et al., 2017). Επίσης η διαλυτότητα επηρεάζεται σημαντικά και από την υδροφοβικότητα και το μέγεθος των μορίων των εκάστοτε πρωτεϊνών. Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες μπορεί, ωστόσο, να υποβαθμίσει την ποιότητα των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή τους. Επίσης επηρεάζονται αρνητικά λειτουργικές ιδιότητες, όπως η δυνατότητα συγκράτησης ελαίου. Έτσι δεν είναι δυνατή η ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα (Qiaoyun et al., 2017).

Από την άλλη πλευρά, η αλκαλική εκχύλιση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη συμβατική μέθοδος για την εκχύλιση πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης (Qiaoyun et al., 2017). Ουσίες, όπως το NaOH και το KOH, χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διατήρηση βασικού pH και την επίτευξη υψηλότερης απόδοσης από την οργανική εκχύλιση. Το βασικό pH έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεΐνη, η οποία με τη σειρά της βελτιώνει την ανάκτηση και την απόδοση της πρωτεΐνης (del Mar Contreras et al., 2019). Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών, επίσης, αυξάνεται με την αύξηση του pH του διαλύτη λόγω του ιονισμού όξινων και ουδέτερων αμινοξέων.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι συνθήκες, όπως η αναλογία δείγματος προς διαλύτη, το pH, η διάρκεια της εκχύλισης και η θερμοκρασία μπορούν να βελτιστοποιηθούν για να επιτευχθεί μέγιστη απόδοση πρωτεΐνης με χαμηλό κόστος (Zhang, Sanders, & Bruins, 2014). Η θερμοκρασία παίζει κρίσιμο ρόλο στην αλκαλική εκχύλιση, σταθεροποιώντας τη δομή της πρωτεΐνης και την αναδίπλωσή της, ενώ παράλληλα βοηθά στη διατήρηση των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων εντός της δομής της πρωτεΐνης. Σε υψηλή θερμοκρασία, η πρωτεΐνη υδρολύεται σε πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους λόγω θερμικής ενέργειας (Sari, Mulder, Sanders, & Bruins, 2015; Zhang, Pan, Venkitasamy, Ma, & Li, 2015). Κατά την εκχύλιση πρωτεϊνών από πίτα ηλίανθου, με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες αναλογίας 67 g/L πρώτης ύλης προς νερό, χρόνου εκχύλισης 1 ώρας και pH 9, ακολουθούμενη από δεύτερη εκχύλιση και καταβύθιση στο ισοηλεκτρικό σημείο, επιτεύχθηκε ανάκτηση πρωτεΐνης 70,4% (Salgado et al. 2012).

Η αλκαλική εκχύλιση διαθέτει πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Από την μία ενισχύει τη βιοδιαθεσιμότητα και την πεπτικότητα της εκχυλισμένης φυτικής πρωτεΐνης, ενώ όμως από την άλλη υποβαθμίζει την ποιότητα της πρωτεΐνης μέσω μετουσίωσης, σχηματισμού λυσινοαλανίνης και απώλειας αμινοξέων (del Mar Contreras et al., 2019; Deleu et al., 2019).

Η αλκαλική εκχύλιση σε υψηλό pH μπορεί να προσφέρει απόδοση πρωτεΐνης άνω του 90%, από σόγια, ελαιοκράμβη και άλλους ελαιούχους σπόρους. Αν και η αλκαλική εκχύλιση μπορεί αναμφίβολα να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης πρωτεϊνών από τις πίτες ελαιούχων σπόρων, ταυτόχρονα επηρεάζει αρνητικά την πεπτικότητα των πρωτεϊνών και αποσυνθέτει τη δομή των αμινοξέων λυσίνη και κυστεΐνη, μειώνοντας τη συνολική ποιότητα και αποδοχή της εκχυλισμένης πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ pH και αποτελεσματικότητας της διεργασίας. Έτσι, η προσαρμογή της ποσότητας πρώτης ύλης και διαλύτη, ειδικά για την κάθε πηγή πρωτεΐνης, μπορεί να βοηθήσει στην ανάκτηση πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας χωρίς να επηρεαστούν τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Οι συμβατικές μέθοδοι για την εκχύλιση πρωτεϊνών μπορούν να εφαρμοστούν σε έναν ευρύτερο αριθμό φυτικών μητρών, συμπεριλαμβανομένων των ελαιούχων σπόρων, των οσπρίων, των δημητριακών και των αγρο-υπολειμμάτων.

Πίνακας 3.1 Συμβατικές εκχυλίσεις ορισμένων σπόρων (Kumar et al., 2021)

Διαλύτης	Φυτική πηγή	Βέλτιστες συνθήκες	Απόδοση	Βιβλιογραφία
Αιθανόλη και πετρελαϊκός αιθέρας	Σπόροι Moringa oleifera	Αναλογία w/v - 8/10 Θερμοκρασία 30 oC χρόνος εκχύλισης 2 h	33%	Chen et al. (2019)
95% Αιθανόλη	Σπόροι Acacia tortilis	Αναλογία w/v - 1/20 Χρόνος εκχύλισης 1 h pH 11	63,7% με επιθυμητές ιδιότητες	Embaby et al. (2018)
0,1 N KOH	Βαμβακόσπορος	Αναλογία w/v - 1/2 Θερμοκρασία 60 oC Χρόνος εκχύλισης 40 min, pH 12,5	70%	Zhang et al. (2009)
1 M NaOH	Πίτουρο ρυζιού	Αναλογία w/v - 6/34 Θερμοκρασία 52 oC Χρόνος εκχύλισης 300 min, pH 10	34,51%	Bernardi (2018)

3.6.2 Ενζυμική εκχύλιση

Η εκχύλιση με υποβοήθηση ενζύμων είναι μια αξιόπιστη προσέγγιση για την ανάκτηση υψηλής ποιότητας φυτικών πρωτεϊνών (Liu, Gasmalla, Li, Yang, 2016; Ochoa-Rivas, Nava-Valde, Serna-Saldívar, Chuck-Hernández, 2017). Το άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα της φυτικής μήτρας λειτουργεί ως εμπόδιο για την διεργασία της εκχύλισης. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης επικεντρώνεται στην ενζυματική αποικοδόμηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η ημικυτταρίνη, η κυτταρίνη και η πηκτίνη (Jung, Lamsal, Stepien, Johnson, Murphy, 2006). Οι πρωτεάσες ως ένζυμα αυξάνουν την απόδοση της διαδικασίας αποσυνδέοντας τις πρωτεΐνες από αυτό το πλέγμα

πολυσακχαριτών. Γενικά, τα ένζυμα απαιτούν σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, για να λειτουργήσουν με τη βέλτιστη καταλυτική τους δραστηριότητα

Οι πίτες ελαιοκράμβης είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες (36-40%) και υδατάνθρακες (35%). Σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί, οι πίτες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με κυτταρινολυτικά, πηκτινολυτικά και ξυλανολυτικά ένζυμα για την εκχύλιση πρωτεϊνών. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα διέσπασαν τα κυτταρικά τοιχώματα υδρολύοντας γλυκάνες και πηκτινικούς πολυσακχαρίτες και αύξησαν αποτελεσματικά την απόδοση της εκχύλισης πρωτεϊνών κατά 1,7 φορές, επιτυγχάνοντας επιτυχή εκχύλιση πρωτεϊνών 74 και 56% από αλεσμένη και ακέραιη πίτα ελαιοκράμβης αντίστοιχα (Rommi et al., 2014). (Rommi et al. 2015) Μια μεταγενέστερη μελέτη πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί η επίδραση του pH στις φυσικοχημικές ιδιότητες των ανακτημένων πρωτεϊνών. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η υδρόλυση των κυτταρικών πολυσακχαριτών μέσω ενζύμων σε pH 6 απέδωσε πρωτεΐνες με υψηλότερη σταθερότητα διασποράς και διαλυτότητα από εκείνες μέσω ισοηλεκτρικής καταβύθισης σε αλκαλικό pH εκχύλισης. Οι εκχυλισμένες πρωτεΐνες ήταν επίσης σταθερές έναντι οξειδωτικών και παρουσίασαν χαμηλό ιξώδες, υποδεικνύοντας την καταλληλότητά τους για εφαρμογές σε τρόφιμα.

3.6.3 Φυσικές μέθοδοι

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων αποτελεί μια τεχνική φυσικής εκχύλισης. Τα υπερηχητικά κύματα προκαλούν κοιλότητες και δημιουργούν σημεία υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης στην φυτική μήτρα. Ο ταχύς σχηματισμός και η κατάρρευση φυσαλίδων αερίου που παράγονται από τα υπερηχητικά κύματα στην κυτταρική επιφάνεια του δείγματος, η μικροροή και τα κρουστικά κύματα ασκούν υψηλή διάτμηση, προκαλώντας διάσπαση της μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος. Ο διαλύτης με αυτό τον τρόπο μπορεί να διεισδύσει αποτελεσματικά στα κύτταρα μέσω των ρωγμών και να δεμσεύσει τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Η συχνότητα και η ισχύς των υπερήχων, η διάρκεια της εκχύλισης, η θερμοκρασία, το pH και η αναλογία στερεού/υγρού είναι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την συγκεκριμένη τεχνολογία εκχύλισης. Σε μελέτη εκχύλισης πρωτεΐνης από ελαιοκράμβη, η διεργασία βελτιστοποιήθηκε στα 80 λεπτά, με ισχύ υπερήχων 450 W και αναλογία δείγματος προς διαλύτη 1:20 (Dong, Guo, et al. 2011). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης πρωτεΐνης αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας από 25 σε 35 °C, ενώ η απόδοση παρέμεινε αμετάβλητη στους 35 και 55 °C και μειώθηκε δραστικά στους 55-65°C.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα είναι άλλη μια αξιοσημείωτη μέθοδος. Τα μικροκύματα είναι μη ιονίζουσες ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες με συχνότητα που κυμαίνεται από 300 MHz έως 300 GHz. Τα μικροκύματα θερμαίνουν το δείγμα μέσω της συνδυασμένης δράσης της περιστροφής διπόλου και της ιοντικής αγωγιμότητας, οδηγώντας σε διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα της φυτικής μήτρας. Αυτή η αντίδραση αυξάνει το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας την διείσδυση του διαλύτη και την αποτελεσματική απελευθέρωση ενδοκυτταρικών ενώσεων. Δεδομένου ότι τα μικροκύματα μετατρέπονται σε θερμική ενέργεια στη μήτρα, η παραγόμενη θερμότητα προκαλεί εξάτμιση της υγρασίας, η οποία δημιουργεί υψηλή πίεση στα κυτταρικά τοιχώματα. Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης πρωτεΐνης από πίτουρο ρυζιού οδήγησε στο αποτέλεσμα ότι η ισχύς των μικροκυμάτων 600-800 W και ο χρόνος 100 δευτερολέπτων είναι οι κατάλληλες παράμετροι. Η συγκεκριμένη

μέθοδος απέδωσε 1,54 φορές περισσότερη πρωτεΐνη από την αλκαλική εκχύλιση (Phongthai, Lim, Rawdkuen, 2016).

Επιστημονικό ενδιαφέρον έχει προσεγγίσει και η εκχύλιση υγρού υπό πίεση πίεσης. Η διεργασία αυτή επιτυγχάνεται σε τρία στάδια. Αρχικά, το δείγμα με το εκάστοτε μέσο εκχύλισης τοποθετείται στο δοχείο πίεσης. Η πίεση αυξάνεται από την ατμοσφαιρική στο απαιτούμενο επίπεδο σε σύντομο χρονικό διάστημα και συνήθως κυμαίνεται από 100 έως 1000 MPa. Καθώς αυξάνεται η πίεση, η διαφορική πίεση μεταξύ του εσωτερικού του φυτικού κυττάρου και του περιβάλλοντος αυξάνεται, προκαλώντας παραμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο διαλύτης διεισδύει με ευκολία μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη στο κύτταρο, αυξάνοντας τη μεταφορά μάζας διαλυτών ενώσεων. Εάν η συμπίεση του δείγματος υπερβεί το όριο παραμόρφωσης του κυττάρου, το κυτταρικό τοίχωμα σπάει και οι δραστικές ενώσεις ρέουν έξω από το κύτταρο και διαλύονται στον διαλύτη. Έπειτα ακολουθεί το στάδιο διατήρησης της πίεσης, όπου η προκαθορισμένη πίεση διατηρείται για ένα χρονικό διάστημα για να εξισορροπηθεί η πίεση μέσα και έξω από το κύτταρο. Ο διαλύτης συνεχίζει να διεισδύει μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα και να διαλύει τα συστατικά. Η απόδοση της εκχύλισης μπορεί να αυξηθεί παρατείνοντας αυτό το στάδιο (Huang, Hsu, Yang, & Wang, 2013). Στο τελικό στάδιο, η πίεση που εφαρμόζεται στο κύτταρο μειώνεται σε ατμοσφαιρική, προκαλώντας την διαστολή και παραμόρφωση του. Με μικρότερο χρόνο εκτόνωσης της πίεσης, σχηματίζονται περισσότεροι πόροι στα κύτταρα, αυξάνοντας την επιφάνεια της πρώτης ύλης και τη διάχυση μιας δραστικής ουσίας, με αποτέλεσμα υψηλή απόδοση εκχύλισης (Chen, Meng, Zhang, Liu, 2009). Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφερθεί στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τρόφιμα με υγρό υπό πίεση. Έχει αναπτυχθεί μοντέλο απόκρισης από ερευνητή για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης πρωτεΐνης που εξάγεται με υψηλή πίεση, ως συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης, μεταξύ 100 και 300 MPa, και του τύπου διαλύτη, όπως ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και TCA/ακετόνη (Altuner 2016). Επίσης έρευνα αναφερόμενη στην εκχύλιση πρωτεΐνης από πίτουρο ρυζιού οδήγησε στο αποτέλεσμα ότι η απόδοη είναι μεγαλύτερη σε πίεση 600-800 Mpa από ό,τι σε 200 MPa (Tang, Hettiarachchy, & Shellhammer, 2002).

Πίνακας 3.2 Φυσικές τεχνικές εκχύλισης σπόρων (Kumar et al., 2021)

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων			
Πηγή	**Βέλτιστες συνθήκες**	**Απόδοση**	**Βιβλιογραφία**
Σπόρος σουσασμιού	Αναλογία w/v - 1/10 Θερμοκρασία 45 °C Χρόνος εκχύλισης 98 min, Ισχύς 836 W, pH 9,5	59,8% με αντιοξειδωτικές ιδιότητες	Görgüç et al. (2019)
Ηλίανθος	Αναλογία w/v - 0,5/10 Θερμοκρασία 45 °C Χρόνος εκχύλισης 15	54,26 % με βελτιώμενες	Dabbour et al. (2018)

	min, pH 8, Ισχύς 220 W	λειτουργικές ιδιότητες	
Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων			
Φιστίκι	Ισχύς 725 W, Χρόνος εκχύλισης 8 min	55%	Ochoa-Rivas et al. (2017)
Πίτουρο ρυζιού	Ισχύς 800 W, Χρόνος εκχύλισης 40 s, pH 8	82,6 % ανάκτηση πρωτεΐνης	Bandyopadhyay et al. (2012)
Εκχύλιση υγρού υπό πίεση			
Νιφάδες σόγιας	Πίεση 200 MPa, Χρόνος εκχύλισης 15 min, Θεμοκρασία 25°C	90%	Jung et al. (2009)
Ρύζι	Πίεση 300 MPa, Χρόνος εκχύλισης 30 min	0,4 mg πρωτεΐνης/g πρώτης ύλης	Kato et al. (2000)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Χαρακτηρισμός Πρωτεϊνών

4.1 Ανάλυση αμινοξέων

Η ανάλυση της σύστασης και του περιεχόμενου σε αμινοξέα αποτελεί βασικό στάδιο για την μελέτη πρωτεϊνών, καθώς μέσω αυτής προσδιορίζεται η διατροφική αξία και η σταθερότητα των πρωτεϊνών. Μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την ανάλυση της σύνθεσης των αμινοξέων αποτελεί η υδρόλυση των πρωτεϊνών και έπειτα η ανάλυσή τους μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Όπως έχει αναφερθεί οι πρωτεϊνές είναι μόρια υψηλού μοριακού βάρους αποτελούμενα από αμινοξέα ενωμένα μέσω πεπτιδικών δεσμών. Για την ανάλυση των πρωτεϊνών σε επίπεδο αμινοξέων απαιτείται αρχικά η διάσπαση αυτών των δεσμών. Η όξινη υδρολύση με πυκνό υδροχλωρικό οξύ και αυξημένη θερμοκρασία εφαρμόζεται συχνά για αυτό τον σκοπό. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι πολύ αποτελεσματική. Ωστόσο, ορισμένα αμινοξέα δύναται να υποστούν αλλοιώσεις ή σημαντική υποβάθμιση. Εναλλακτικές μέθοδοι είναι η ενζυμική υδρόλυση με χρήση πρωτεασών και η αλκαλική υδρόλυση, η οποία επίσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την δομή των αμινοξέων. Μετά την υδρόλυση ακολουθεί ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Σύνηθης πρακτική αποτελεί ο σχηματισμός παραγώγων με χρήση αντιδραστηρίων, όπως το OPA και το PITC, καθώς τα αμινοξέα απορροφούν περιορισμένα στην υπεριώδη περιοχή. Η χρωματογραφία πραγματοποιείται σε στήλη αντιστρόφου φάσεως με κινητή φάση ρυθμιστικά διαλύματα ή οργανικούς διαλύτες και η ανίχνευση με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται σε φάσματα αμινοξέων γνωστής συγκέντρωσης.

4.2 Ιδιότητες πρωτεϊνών

Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορούν να χωριστούν σε υποκατηγορίες και, συγκεκριμένα, δομικές ιδιότητες, ρεολογικές ιδιότητες, οργανοληπτικές ιδιότητες και λειτουργικές ιδιότητες. Όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες, αυτές αποτελούν τα χαρακτηριστικά ενός προϊόντος, κυρίως τροφίμων, που μπορούν να γίνουν αντιληπτά από τα ανθρώπινα αισθητήρια όργανα, δηλαδή την όραση, την αφή, τη γεύση και την όσφρηση. Αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνουν το χρώμα, την εμφάνιση, την υφή, τη γεύση και την οσμή, και είναι κρίσιμες για την αξιολόγηση της ποιότητας και της αποδοχής ενός προϊόντος από τους καταναλωτές. Σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες, γενικά με τον όρο λειτουργικότητα πρωτεϊνών ορίζεται το σύνολο των ιδιοτήτων που επηρεάζουν την χρήση τους σε τρόφιμα. Λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών είναι εκείνες οι φυσικές και χημικές ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν την συμπεριφορά τους στα συστήματα τροφίμων κατά την παραγωγή, αποθήκευση, προετοιμασία και κατανάλωση και συνεπώς επηρεάζουν την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Οι ιδιότητες αυτές χρησιμεύουν στον καθορισμό της χρησιμοποίησης αυτών σε συστήματα τροφίμων (Ταούκης, 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν η διαλυτότητα, η ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου, η ικανότητα σχηματισμού αφρού και η σταθερότητά του κ.α.

4.2.1 Χρωματομετρία

Το χρώμα αποτελεί σημαντικό λειτουργικό χαρακτηριστικό των τροφίμων, καθώς συνδέεται άμεσα με την αποδοχή τους από τον καταναλωτή, με την χημική τους σύσταση και τον βαθμό επεξεργασίας που έχουν υποστεί. Η μέτρηση του χρώματος επιτυγχάνεται μέσω της χρωματομετρίας, η οποία βασίζεται σε διεθνώς αναγνωρισμένα συστήματα αναπαράστασης χρωμάτων. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα στην βιομηχανία τροφίμων είναι το CIELAB που αναπτύχθηκε το 1976. Σύμφωνα με αυτό, το χρώμα ερμηνεύεται με τρεις παραμέτρους, το L που είναι δείκτης της φωτεινότητας και κυμαίνεται από 0 έως 100, όπου το 0 είναι στο μαύρο και το 100 στο λευκό, το a που είναι δείκτης στον άξονα πράσινο – κόκκινο, όπου στις αρνητικές τιμές βρίσκεται το πράσινο και στις θετικές το κόκκινο, και τέλος το b που αποτελεί δείκτη στον άξονα μπλε – κίτρινο, στον οποίο οι αρνητικές τιμές παριστάνουν μπλε και οι θετικές κίτρινο χρώμα.

Η μέτρηση του χρώματος πραγματοποιείται με χρωματόμετρο, αναλύοντας την αντανάκληση ή διαπερότητα του φωτός από το δείγμα και υπολογίζοντας τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων. Στην βιομηχανία τροφίμων, η ανίχνευση του χρώματος είναι σημαντική όχι μόνο για την οργανοληπτική ποιότητα του προϊόντος αλλά μπορεί επίσης να εντοπίσει χημικές μεταβολές που έχουν λάβει χώρα κατά την επεξεργασία (π.χ. αντιδράσεις Maillard) ή ακόμα και ανεπιθύμητες αντιδράσεις που υποβαθμίζουν την διατροφική αξία του τροφίμου.

4.2.2 Διαλυτότητα

Εξαιτίας του μεγέθους του μορίου τους, οι πρωτεΐνες δεν σχηματίζουν πραγματικά διαλύματα στο νερό. Όταν αναφέρεται η διαλυτότητα μίας πρωτεΐνης εννοείται η «διασκορπισιμότητα» αυτής. Η διασπορά μίας πρωτεΐνης στο νερό έχει τις ιδιότητες μίας κολλοειδούς διασποράς και όχι ενός πραγματικού διαλύματος (Ταούκης, 2019). Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται από την δομή των μορίων τους, την σύσταση τους σε αμινοξέα καθώς και από το διαλυτικό μέσο. Για να καταστεί διαλυτή μία πρωτεΐνη πρέπει να αλληλεπιδρά με τον διαλύτη όσο το δυνατόν περισσότερο σχηματίζοντας δεσμούς, όπως δεσμούς υδρογόνου, υδροφοβικές και ιοντικές αλληλεπιδράσεις.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών είναι συνάρτηση παραγόντων, όπως το pH, η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η θερμοκρασία και το είδος του διαλύτη (Ταούκης, 2019). Τα πρωτεϊνικά μόρια λόγω της φύσης τους μπορούν να συμπεριφέρονται είτε ως οξέα είτε ως βάσεις. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει μία ειδική τιμή, το ισοηλεκτρικό σημείο όπου η διαλυτότητα ελαχιστοποιείται. Σε τιμές pH υψηλότερες ή χαμηλότερες από το ισοηλεκτρικό σημείο, τα πρωτεϊνικά μόρια φορτίζονται και η διαλυτότητα ενισχύεται. Η διαλυτότητα είναι επίσης μεγαλύτερη σε αλκαλικά από ό,τι σε όξινα pH. Παράλληλα, τα ιόντα αλάτων σε συγκεντρώσεις 0,5 – 1 M αυξάνουν την διαλυτότητά τους, επηρεάζοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Επιπλέον, η διαλυτότητα αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας από 0 – 50 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, οι πρωτεΐνες μπορεί να μετουσιωθούν και επίσης σε χαμηλές η διαλυτότητα μειώνεται. Τέλος, ορισμένοι οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η ακετόνη μειώνουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.

Η διαλυτότητα παίζει σημαντικό ρόλο σε προϊόντα τροφίμων, καθώς μεταξύ άλλων επηρεάζει την σταθερότητα και την βιοδιαθεσιμότητα των συσταστικών του τροφίμου. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών ορού επηρεάζει την σταθερότητα του γάλακτος, την δομή

του γιαουρτιού και την υφή των τυριών. Στις φυτικές πρωτεΐνες, όπως σόγιας και μπιζελιού, η διαλυτότητα καθορίζει την δυνατότητα σχηματισμού ομοιογενών ροφημάτων και τη χρήση τους ως συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής. Επιπλέον, η διαλυτότητα σχετίζεται με ιδιότητες όπως ο αφρισμός και η γαλατωματοποίηση, που είναι απαραίτητες ιδιότητες στην αρτοποιΐα και την ζαχαροπλαστική. Η διαλυτότητα μπορεί να βελτιωθεί με τροποποίηση pH, θερμική κατεργασία και χρήση ενζύμων, με σκοπό την ανάπτυξη νέων προϊόντων με βελτιωμένη σταθερότητα και αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Damodaran, 2010; Stone et al., 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εκμετάλλευση των παραπροϊόντων της βιομηχανικής επεξεργασίας βαμβακιού, για την απομόνωση πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας από τα απελαιωμένα παραπροϊόντα σύνθλιψης βαμβακόσπορου και την μελέτη των ιδιοτήτων τους. Οι μέθοδοι και οι διεργασίες που επιλέγονται για την επίτευξη αυτού του στόχου, στηρίζονται σε βιβλιογραφική ανασκόπηση της τρέχουσας επιστημονικής γνώσης και σε άλλες μεθόδους που έχουν εφαρμοσθεί και έχουν ως γνώμονα τη χρήση περιβαλλοντικά βιώσιμων και οικονομικά σύμφορων τεχνολογιών. Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόσθηκε.

5.1.1 Ανάκτηση πρωτεϊνών

Για την ανάκτηση της πρωτεΐνης από την βαμβακόπιτα, εφαρμόστηκαν τρεις διακριτικές τεχνικές εκχύλισης, συμβατική, εκχύλιση συνδυασμένη με μικροκύματα και υπερήχους και εκχύλιση υγρού υπό πίεση. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε ενζυμική προκατεργασία στην εκχυλιστική μέθοδο που παρείχε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης, με στόχο την περαιτέρω ενίσχυση της αποδοτικότητας. Σε όλες τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά νερό ως εκχυλιστικός διαλύτης, ενώ το pH προσαρμόστηκε σε αλκαλικές τιμές, δεδομένου ότι έχει τεκμηριωθεί η ευνοϊκή επίδραση αυτών των συνθηκών διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών.

Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε σε συνδυασμό ανασκόπησης της διεθνούς βιβλιογραφίας και προκαταρκτικών δοκιμαστικών πειραμάτων, με σκοπό την επιλογή των κρίσιμων παραμέτρων προς διερεύνηση. Οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ως ανεξάρτητοι παράγοντες ήταν τρεις βασικές παράμετροι που επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την απόδοση της εκχύλισης, ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές για την ελαχιστοποίηση των πειραματικών αποκλίσεων. Η επιλογή αυτού του σχεδιασμού επέτρεψε τη βελτιστοποίηση της διεργασίας και την αξιόπιστη σύγκριση των διαφορετικών τεχνολογιών εκχύλισης.

Οι σταθερές παράμετροι σε όλες τις εκχυλίσεις ήταν η ανάδευση στα 280 rpm και ο διαλύτης (νερό σε αλκαλικές συνθήκες). Για το σχεδιασμό των πειραμάτων στο πλαίσιο της συμβατικής εκχύλισης (CE) πραγματοποιήθηκε πλήρως παραγοντικό μοντέλο με δύο μεταβλητές – χρόνος (30-120 min) και αναλογία στερεού/διαλύτη (0,03-0,1 w/v). Στις εκχυλίσεις PLE και MUAE εφαρμόστηκε ο πειραματικός Box-Behnken και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απόκρισης επιφανειών (Response

Surface Methodology – RSM). Όσον αφορά τη PLE, οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης και η αναλογία στερεού/διαλύτη και κυμαίνονταν μεταξύ 50-150°C, 3-10 min και 0,03-0,1 w/v, αντιστοίχως. Κατά τη MUAE, η διάρκεια της εκχύλισης διατηρήθηκε στα 10 λεπτά και η θερμοκρασία στους 40°C, ενώ μελετήθηκαν η ισχύς των μικροκυμάτων (MW), η ισχύς των υπέρηχων (US) και η αναλογία στερεού/διαλύτη με εύρη 200-500 W, 450-700 W και 0,03-0,1 w/v, αντίστοιχα.

5.2 Υλικά

Σε αυτή την παράγραφο αναλύονται οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν.

5.2.1 Πρώτες Ύλες

Η βαμβακόπιτα προμηθεύτηκε από την εταιρία Agroinvest S. A. που εδράζεται στην Αθήνα. Σύμφωνα με τη διαδικασία παραγωγής βαμβακέλαιου, οι βαμβακόσποροι συμπιέζονται μηχανικά πριν από την εκχύλιση του ελαίου με εξάνιο, η βαμβακόπιτα στη συνέχεια ξηραίνεται και τελικά αλέθεται πριν από την περαιτέρω χρήση στο πλαίσιο των εκχυλίσεων πρωτεϊνών που θα διενεργηθούν για τους σκοπούς της διπλωματικής εργασίας.

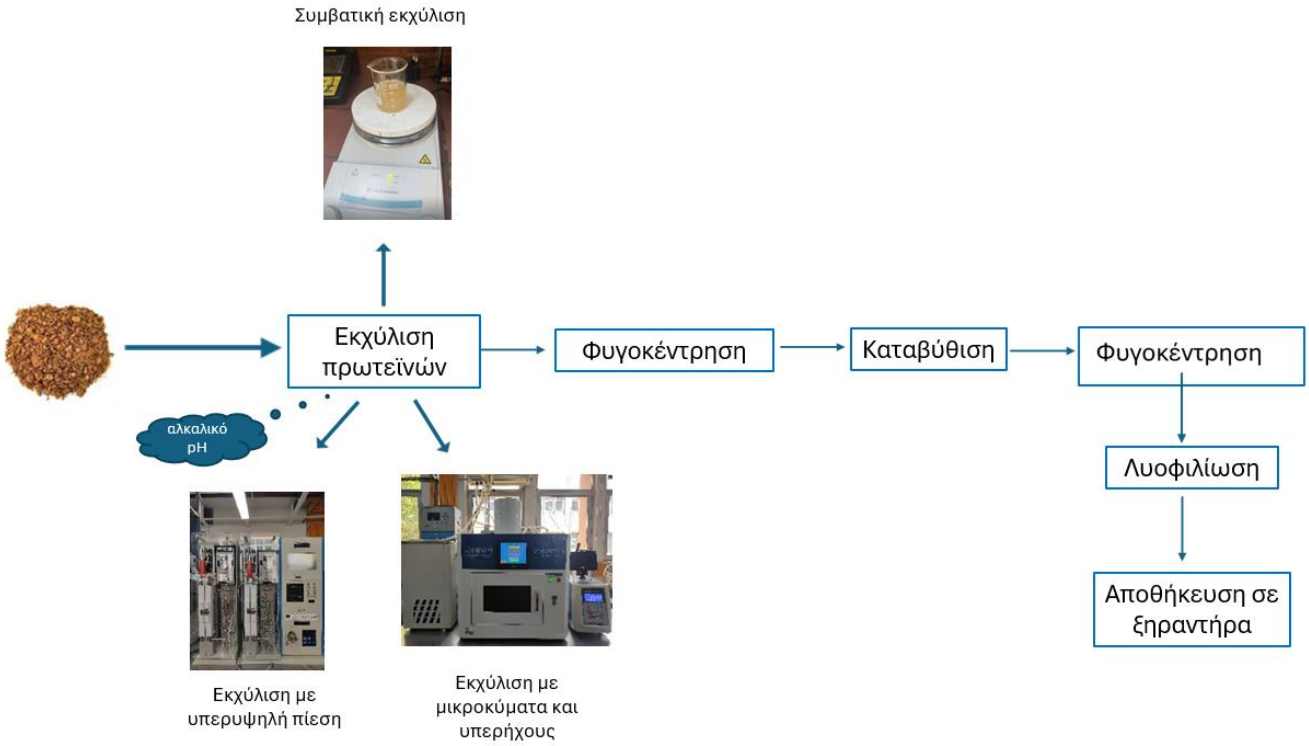
Εικόνα 5.1 Βαμβακόπιτα έπειτα από άλεση

5.2.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τις εκχυλίσεις ήταν απιονισμένο νερό. Το pH στα διαλύματα ρυθμίστηκε με χρήση υδροχλωρικού οξέος και καυστικού νατρίου. Υγρό υδροχλωρικό οξύ και υδροξείδιο του νατρίου προμηθεύτηκαν από τον εμπορικό οίκο Fischer Chemical (Leicestershire, UK). Παράλληλα, για την ενζυμική κατεργασία έγινε χρήση πρωτεάσης, ένζυμο που δύναται να συνεισφέρει στην διάσπαση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και την διαλυτοποίηση της. Έγινε χρήση πρωτεάσης του φυτού Aspergillus saitoi και αγοράστηκε από την εταιρία βιοτεχνολογίας Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Όσον αφορά την προετοιμασία του διαλύματος Lowry, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu's προμηθεύτηκε από την εταιρία εργαστηριακού εξοπλισμού Carlo Erba (Emmendingen, Germany), ενώ η πρότυπη ουσία BSA (Bovine Serum Albumine) ήταν την εταιρίας Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Επίσης, το θειϊκο οξύ, το κάλιο και ο θειϊκός χαλκός αποτελούν προϊόντα του οίκου Fischer Chemical (Leicestershire, UK).

5.3 Μεθοδολογία

Η βασική διεργασία, που πραγματοποιείται στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, είναι η αλκαλική εκχύλιση. Μετά από κάθε εκχύλιση ακολουθεί φυγοκέντρηση και απορρίπτεται το στερεό υπόλειμμα ώστε να διατηρηθεί το επιθυμητό εκχύλισμα. Ακολουθεί η διαδικασία της καταβύθισης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σταθεροποίηση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο με χρήση διαλύματος HCl 1M και ψύξη στους 4 °C για 24 ώρες. Έπειτα από φυγοκέντριση, λήφθηκε το στερεό υπόλειμμα, καταψύχθηκε στους -80°C, ώστε να περάσει τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Τέλος, λήφθηκε το τελικό προϊόν πρωτεΐνης σε μορφή σκόνης και αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα.



Εικόνα 5.2 Πειραματική διαδικασία εκχύλισης και παραλαβής του τελικού καταβυθιζούμενου στερεού

Για την κατάψυξη χρησιμοποιήθηκε ο καταψύκτης Panasonic, MDF-U3386S.

Εικόνα 5.3 Καταψύκτης Panasonic, MDF-U3386S, -80 °C

Για την λυοφιλίωση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Leybold – Heraeus, GT 2A.

Εικόνα 5.4 Όργανο λυοφιλίωσης Leybold – Heraeus, GT 2A

Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με την συσκευή Multiparameter Bench Meter (Mi 180, MARTINI instruments). Αρχικά, διενεργήθηκε βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH. Κατόπιν σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε επαρκής ποσότητα δείγματος έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο να ήταν εμβαπτισμένο και να μην ακουμπούσε στα τοιχώματα του ποτηριού. Η θερμοκρασία του δείγματος έπρεπε να είναι 20 – 25°C. Όταν η τιμή σταθεροποιούταν, λαμβανόταν η μέτρηση.

Εικόνα 5.5 Συσκευή Multiparameter Bench Meter για μέτρηση του pH

5.4 Ανάκτηση πρωτεϊνών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα ήταν εκχύλιση συμβατική, υποβοηθουμένη από μικροκύματα και υπερήχους, με υγρό υπό πίεση και ενζυμική. Σκοπός ήταν η βελτιστοποίηση των ανεξάρτητων παραμέτρων σε κάθε τεχνολογία εκχύλισης ώστε να βρεθεί το σημείο της μέγιστης ανακτημένης πρωτεϊνης στο τελικό καταβυθιζούμενο στερεό. Ακολούθως παρουσιάζεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία για κάθε τεχνική.

5.4.1 Συμβατική εκχύλιση

Αρχικά ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα πρώτης ύλης ώστε να είναι συναφής με την επιθυμητή αναλογία στερεού/υγρού και πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση. Το pH κατά την διάρκεια της διεργασίας ελέχθηκε τακτικά με χρήση pHμέτρου και πρόσθηκη στάγδην διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1 M, ώστε να διατηρηθεί στην επιθυμητή βασική τιμή, ενώ πραγματοποιήθηκε ανάδευση για όλη την διάρκεια της εκχύλισης. Οι μεταβλητές αριστοποίσης στις συμβατικές εκχυλίσεις ήταν η αναλογία στερεού υγρού και ο χρόνος.

Πίνακας 5.1 Μεταβλητές παράμετροι συμβατικών εκχυλίσεων

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Χρόνος (min)
1	0,10	30
2	0,10	60
3	0,10	120
4	0,04	30
5	0,04	60
6	0,04	120

7	0,03	30
8	0,03	60
9	0,03	120

5.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και υπερήχους

Οι ανεξάρτητες παράμετροι για την συγκεκριμένη τεχνολογία εκχύλισης ήταν η ένταση των μικροκυμάτων και των υπερήχων καθώς και η αναλογία πρώτης ύλης και υγρού διαλύτη. Ακολούθως παρατίθενται οι ανεξάρτητες παράμετροι που προέκυψαν από τον σχεδιασμό πειραμάτων.

Αρχικά προσδιορίστηκε η επίδραση του χρόνου στην διεργασία πραγματοποιώντας πείραμα με παραμέτρους έντασης μικροκυμάτων και υπερήχων 200 και 450 W αντίστοιχα και αναλογία στερεού/υγρού 1/25 w/v για χρονικά διαστήματα 5, 10 και 15 λεπτών. Έτσι διενεργήθηκαν τα ακόλουθα πειράματα στον βέλτιστο χρόνο που ευρέθηκε.

Πίνακας 5.2 Ανεξάρτητες μεταβλητές εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από μικροκύματα και υπερήχους

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Ισχύς μικροκυμάτων (W)	Ισχύς υπερήχων (W)
1	0,1	0	450
2	0,1	200	0
3	0,1	200	700
4	0,1	500	450
5	0,04	0	0
6	0,04	0	700
7	0,04	200	450
8	0,04	500	0
9	0,04	500	700
10	0,03	0	450
11	0,03	200	0
12	0,03	200	700
13	0,03	500	450

Οι ανωτέρω εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του οργάνου XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd., Nanjing City, China).

Εικόνα 5.6 Διάταξη εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα και υπερήχους

5.4.3 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση

Για την ανάκτηση πρωτεϊνών με υπερκρίσιμη εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα PLE® Pressurized Liquid Extraction (Fluid Management Systems, Watertown, ΗΠΑ). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα εκχύλισης από ανοξείδωτο χάλυβα 100 mL και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό σε αλκαλικές συνθήκες. Η πίεση εκχύλισης διατηρήθηκε στα 1750 psi. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης αξιολογήθηκε η επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού, η θερμοκρασίας εκχύλισης και ο χρόνος εκχύλισης, με εύρη 0,03-0,10 g/mL, 50-150°C και 3-10 λεπτά αντίστοιχα.

Πίνακας 5.3 Παράμετροι εκχυλίσεων υγρού υπό πίεση

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
1	0,10	100	3
2	0,10	100	10
3	0,10	50	6
4	0,10	150	6
5	0,04	50	3
6	0,04	50	10
7	0,04	100	6
8	0,04	150	3
9	0,04	150	10
10	0,03	50	6
11	0,03	100	3

12	0,03	100	10
13	0,03	150	6

Εικόνα 5.7 Διάταξη εκχύλισης υγρό υπό πίεση Pressurised Liquid Extraction

5.4.4 Ενζυμική προκατεργασία

Στις βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης με τα καλύτερα αποτελέσματα, διενεργήθηκε το πείραμα προκατεργασίας με ένζυμο. Χρησιμοποιήθηκε πρωτεάση του φυτού Aspergillus saitoi (0,6 U/ g στερεού ενζύμου) και η κατεργασία διήρκησε 2 ώρες. Έπειτα της προκατεργασίας, ακολούθησε η εκχυλιστική μέθοδος, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Οι παράμετροι της προκατεργασίας με ένζυμο αποφασίστηκαν μέσω προκαταρκτικών πειραμάτων. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 12 U/g πρώτης ύλης και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C και pH 7,5 με σταθερή ανάδευση στην αναλογία στερεού/διαλύτη της αντίστοιχης μεθόδου.

Εικόνα 5.8 Θερμοστατικό λουτρό για ενζυμική κατεργασία

5.5 Ισοηλεκτρικό σημείο

Την όλη διεργασία διήπε αρχικά η απομόνωση των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα κι έπειτα η παραλαβή τους ως στερεό με όξινη καταβύθιση. Έτσι έρεπε, αρχικά, να βελτιστοποιηθεί το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ώστε να λαμβανόταν η μέγιστη δυνατή καταβυθιζούμενη μάζα μετά από κάθε εκχύλιση.

Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκε συμβατική εκχύλιση 1:25 w/v αναλογίας στερεού / υγρού και διάρκειας 60 λεπτών. Έπειτα το εκχύλισμα χωρίστηκε σε μικρότερους όγκους και πραγματοποιήθηκε καταβύθιση σε pH 3,5 – 5,5.

5.6 Μέτρηση χαρακτηριστικών πρώτης ύλης, εκχυλισμάτων και τελικών προϊόντων

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη των υγρών εκχυλισμάτων και των αποξηραμένων δειγμάτων ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Lowry. Η μέθοδος βασίζεται σε δύο χημικές αντιδράσεις. Η πρώτη είναι η αντίδραση των ιόντων χαλκού με πρωτεΐνες σε αλκαλικές συνθήκες και ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων με βαθύ μπλε χρώμα και η δεύτερη είναι η αντίδραση του σχηματιζόμενου συμπλόκου με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών (mg πρωτεϊνών/mL διαλύματος) πραγματοποιήθηκε μέσω φασματομετρίας με τη παρακάτω καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με χρήση της πρότυπης ουσίας BSA (Bovine Serum Albumine). [$y = 1.8815x + 0.0412$ (A_{750}-$C_{mg/mL}$)]

Το precipitation yield (απόδοση εκχύλισης) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$PY\ (\%) = \frac{M_1}{M_2} \cdot 100 \quad (1)$$

όπου M1 ήταν η ξηρή μάζα του εκχυλίσματος που καθίζανε (g) και M2 το αρχικό βάρος της βαμβακόπιτας (g)

Για το λυοφιλιοποιημένο τελικό στερεό, τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν πρώτα σε απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί αναλογία στερεού/υγρού 0,4 mg/mL και το pH του διαλύματος στη συνέχεια ρυθμίστηκε στο 10 χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα. Έτσι υπολογίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος με την μέθοδο Lowry και τελικά και η περιεχόμενη πρωτεΐνη στο τελικό στερεό.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της πρώτης ύλης προσδιορίστηκε με την μέθοδο Kjeldahl ακολουθώντας την πρότυπη μέθοδο AOAC 984.13, μέσω της οποίας προσδιορίζεται το οργανικό άζωτο και περιλαμβάνει τρία βήματα: καύση παρουσία ισχυρού οξέος (συνήθως θειϊκού οξέος), απόσταξη και τιτλοδότηση. Κατά το πρώτο στάδιο παράγεται θειϊκό αμμώνιο, το οποίο έπειτα σε αλκαλικές συνθήκες μετατρέπεται σε αμμωνία και εκτίθεται σε απόσταξη. Η ποσότητα της αμμωνίας ποσοτικοποιείται με ογκόμετρηση. Το επί τοις εκατό ποσοστό του περιεχόμενου αζώτου υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$N\% = \frac{1.4*(A-B)*0.5}{m} \quad (2)$$

Όπου A = ml NaOH για την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος

B = ml NaOH για την τιτλοδότηση του δείγματος

m = μάζα δείγματος

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα σε άζωτο με τον κατάλληλο συντελεστή (F=5,30 για την βαμβακόπιτα).

$$\pi\rho\omega\tau\varepsilon\ddot{\imath}\nu\varepsilon\varsigma\% = F * N\% \quad (3)$$

Εικόνα 5.9 Σύστημα απόσταξης Kjeldahl K380

Η ανάκτηση πρωτεΐνης του υγρού εκχυλίσματος (PR_E, %) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$PR_E\ (\%) = \frac{PC_E}{PC_C} \cdot 100 \quad (4)$$

όπου PC_E ήταν η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο υγρό εκχύλισμα (mg/g) και PC_C η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της βαμβακόπιτας (mg/g).

Η ανάκτηση πρωτεΐνης στο καταβυθιζούμενο στερεό (PR_P, %) υπολογίστηκε:

$$PR_P\ (\%) = \frac{M_P \cdot PC_P}{M_C \cdot PC_C} \cdot 100 \quad (5)$$

όπου M_P είναι η ξηρή μάζα του καταβυθιζούμενο στερεού (g), M_C το αρχικό βάρος της βαμβακόπιτας (g), PC_P είναι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στην καταβυθιζούμενη μάζα (mg/g) και PC_C η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της βαμβακόπιτας (mg/g).

Το PR_E αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης στη μεταφορά μορίων πρωτεΐνης από την πρώτη ύλη της βαμβακόπιτας στον διαλύτη. Από την άλλη, το PR_P αντιπροσωπεύει τηη συνδυασμένη απόδοση των διεργασιών εκχύλισης και καταβύθισης, καθώς ποσοτικοποιεί το ποσοστό της πρωτεΐνης που ανακτάται στην καταβυθιζούμενη μάζα σε σχέση με τη συνολική πρωτεΐνη που είναι διαθέσιμη στην πρώτη ύλη.

5.7 Ανάλυση σύνθεσης αμινοξέων

Η απομονωμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκε σε υδρόλυση κενού. Συγκεκριμένα, 20 μg πρωτεΐνης από τις βέλτιστες συνθήκες της κάθε μεθόδου μεταφέρθηκαν σε σωλήνες υδρόλυσης κενού 1 mL που περιείχαν 200 μL από 6 M HCl και 1% (w/w) κρυστάλλους φαινόλης, οι οποίοι χρησίμευσαν ως δεσμευτές οξυγόνου. Οι σωλήνες καθαρίστηκαν με αέριο άζωτο και στη συνέχεια εφαρμόστηκε κενό. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 116 °C για 24 ώρες. Μετά την υδρόλυση, η περίσσεια οξέος απομακρύνθηκε και τα υπολείμματα διαλύθηκαν σε 20 μL 20 mM HCl σταθερής θερμοκρασίας βρασμού. Τα αμινοξέα μετασχηματίστηκαν σε παράγωγα και αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπου η κινητή φάση αποτελούταν από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού-φωσφορικού, ακετονιτρίλιο και νερό.

5.8 Χρωματομετρία

Η μελέτη του χρώματος των απομονωμένων πρωτεϊνών στις βέλτιστες συνθήκες της κάθε μεθόδου και ο υπολογισμός των παραμέτρων του συστήματος CIELAB πραγματοποιήθηκε με το όργανο MiniScan XE, Serial No. 3759, Model No. 45/0-S, Hunter Associates Laboratory, Reston, VA.

Εικόνα 5.10 Χρωματόμετρο MiniScan XE

5.9 Διαλυτότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών

Η διαλυτότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών στις βέλτιστες συνθήκες κάθε μεθόδου προσδιορίστηκε ως συνάρτηση του pH. Το στερεό διαλύθηκε σε ρυθμιστικά διαλύματα pH 4, 7 και 10. Τα δείγματα αναδεύθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο υπερκείμενο υγρό προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry. Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης υπολογίστηκε διαιρώντας την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο υπερκείμενο υγρό με τη συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στη σκόνη που χρησιμοποιήθηκε.

5.10 Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την εξέταση των διακυμάνσεων μεταξύ των διαφορετικών εξεταζόμενων ομάδων. Όπου ήταν εφαρμόσιμο, η δοκιμασία post-hoc του Tukey (α = 0,05) εντόπισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων. Όλες οι στατιστικές διαδικασίες πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας το λογισμικό STATISTICA, έκδοση 12.0 (StatSoft, Αμβούργο, Γερμανία).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Πρωτεϊνικό περιεχόμενο πρώτης ύλης

Αρχικά προσδιορίζεται το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της βαμβακόπιτας με την πρότυπη μέθοδο Kjeldahl.

Πίνακας 6.1 Περιεχόμενη πρωτεΐνη στην βαμβακόπιτα

Πρωτεϊνικό περιεχόμενο (%, g πρωτεΐνης/g πρώτης ύλης)	**21,9 ± 0,5**

Το ποσοστό είναι αναμενόμενα υψηλό λαμβάνοντας υπόψιν την τρέχουσα βιβλιογραφία που υπαγορεύει ποσοστά της τάξης 17,0 – 66,4% για πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε άλευρα σπόρων της βιομηχανίας βρώσιμων ελαίων.

Οι Flatie et al. (2023) υπολόγισαν με την μέθοδο Kjeldahl ποσοστό 35,47% περιεχόμενης πρωτεΐνης στην βαμβακόπιτα, χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μετατροπής αζώτου 6,25. Η συγκεκριμένη απόκλιση, πέρα από τον συντελεστή, μπορεί να οφείλεται στον προμηθευτή, την ιδιαιτερότητα της πρώτης ύλης καθώς και σε προεπεξεργασία για απομάκρυνση της γκοσυπόλης.

6.2 Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου

Υπολογίζεται το ισοηλεκτρικό σημείο στο οποίο οι πρωτεΐνες εμφανίζουν την ελάχιστη διαλυτότητα και μπορούν να καταβυθιστούν.

Πίνακας 6.2 Επίδραση pH στην καταβυθιζούμενη μάζα

pH	Καταβυθιζούμενη μάζα (mg)
3,70	$64,8 \pm 0,3^{a}$
4,12	$65,4 \pm 0,2^{a}$
4,55	$63,1 \pm 0,3^{b}$
4,78	$60,8 \pm 0,3^{c}$

5,00	59,3 ± 0,2[d]
5,23	58,6 ± 0,4[d,e]
5,46	57,8 ± 0,4[e]

Η στατιστική σημαντικότητα (p<0,05) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Το βέλτιστο pH για την καταβύθιση, στο οποίο παρουσιάζεται η μέγιστη καταβυθιζούμενη μάζα, υπολογίζεται στο 4,05 και χρησιμοποιείται έπειτα από όλες τις μεθόδους εκχύλισης στην διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Σύμφωνα με τους Buning Zhang et al. (2009) το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεϊνης βαμβακόσπορου βρίσκεται μεταξύ 4 – 5, γεγονός που συνάδει με το αποτέλεσμα του πειράματος.

6.3 Εκχυλίσεις σε pH 8

6.3.1 Συμβατική εκχύλιση

Όσον αφορά την συμβατική εκχύλιση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για αναλογίες στερεού/διαλύτη 0,03-0,1 w/v και χρόνους εκχύλισης 30–120 min. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.2, το ΡΥ κυμαίνεται μεταξύ 2,2-5,3%. Το PC_E βρίσκεται στο διάστημα 7,8-43,2.

Πίνακας 6.3 Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης σε pH 8

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Χρόνος (min)	PC_E (mg/g)	ΡΥ (%)
1	0,10	30	7,8 ± 1,2[f]	2,4 ± 0,3[d]
2	0,10	60	11,5 ± 1,5[e,f]	3,9 ± 0,5[b,c]
3	0,10	120	24,7 ± 2,1[c]	5,3 ± 0,6[a]
4	0,04	30	17,4 ± 1,9[d,e]	2,3 ± 0,3[d]
5	0,04	60	38,4 ± 2,4[a]	2,9 ± 0,3[c,d]
6	0,04	120	43,2 ± 2,6[a]	4,2 ± 0,5[a,b]
7	0,03	30	21,7 ± 2,0[c,d]	2,4 ± 0,2[d]
8	0,03	60	31,0 ± 2,2[b]	2,5 ± 0,3[d]
9	0,03	120	40,0 ± 2,5[a]	2,8 ± 0,3[c,d]

Η στατιστική σημαντικότητα (p<0,05) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

6.3.2 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση

Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση διενεργήθηκε για αναλογίες στερεού/υγρού 0,03-0,1 w/v, θερμοκρασίες 50-100°C και χρόνους εκχύλισης 3-10 min. Το ΡΥ λαμβάνει τιμές από 1,3-8,3% και το PC_E μεταξύ 21,7-75,6.

Πίνακας 6.4 Αποτελέσματα εκχύλισης με υγρό υπό πίεση σε pH 8

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	PC_E (mg/g)	ΡΥ (%)
1	0,10	100	3	$22,2 \pm 2,1^{d}$	$3,8 \pm 0,5^{b}$
2	0,10	100	10	$25,0 \pm 2,2^{d}$	$2,5 \pm 0,3^{c,d}$
3	0,10	50	6	$21,7 \pm 2,0^{d}$	$2,2 \pm 0,2^{d,e}$
4	0,10	150	6	$41,6 \pm 3,3^{b,c}$	$8,3 \pm 0,9^{a}$
5	0,04	50	3	$22,2 \pm 2,2^{d}$	$2,4 \pm 0,3^{c,d,e}$
6	0,04	50	10	$34,0 \pm 2,6^{c}$	$3,5 \pm 0,4^{b,c}$
7	0,04	100	6	$39,8 \pm 3,2^{b,c}$	$4,4 \pm 0,5^{b}$
8	0,04	150	3	$44,2 \pm 3,2^{b}$	$1,3 \pm 0,1^{e}$
9	0,04	150	10	$83,8 \pm 5,1^{a}$	$2,0 \pm 0,2^{d,e}$
10	0,03	50	6	$36,8 \pm 2,5^{b,c}$	$2,4 \pm 0,2^{c,d,e}$
11	0,03	100	3	$23,2 \pm 2,2^{d}$	$3,7 \pm 0,4^{b}$
12	0,03	100	10	$38,0 \pm 2,4^{b,c}$	$4,6 \pm 0,5^{b}$
13	0,03	150	6	$75,6 \pm 4,9^{a}$	$1,8 \pm 0,1^{d,e}$

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

6.3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους

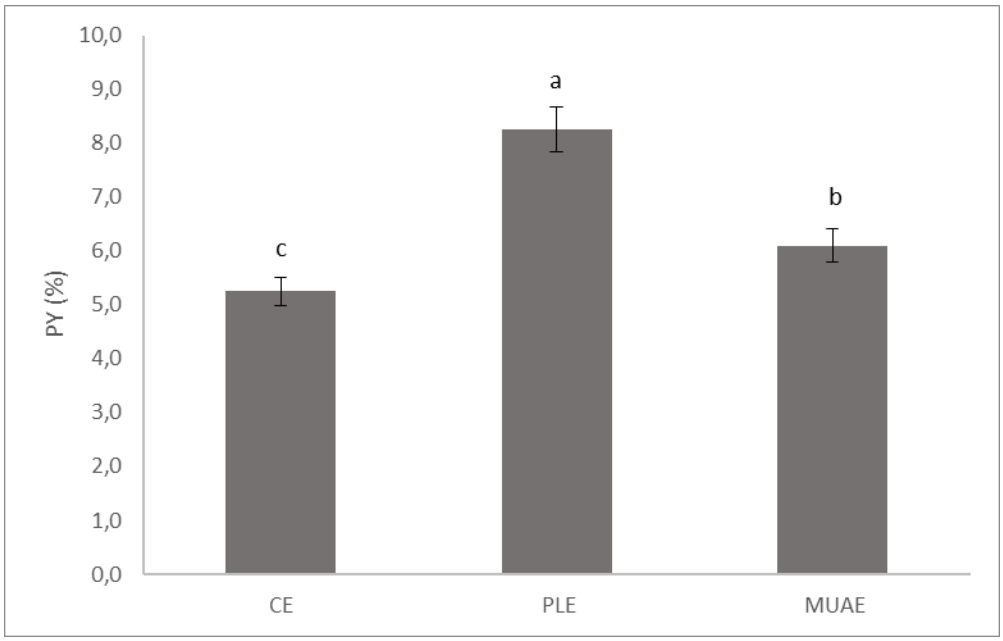
Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων και μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκε για αναλογίες στερεού/υγρού 0,03-0,1 w/v, ισχύ υπερήχων 450-700 W και ισχύ μικροκυμάτων 200-500 W. Το ΡΥ κυμαίνεται στο διάστημα 1,5-6,1% και το PC_E μεταξύ 17,0-34,4.

Πίνακας 6.5 Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα και υπερήχους σε pH 8

Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Ισχύς μικροκυμάτων (W)	Ισχύς υπερήχων (W)	Χρόνος (min)	PC_E (mg/g)	PY (%)
1	0,1	0	450	10	$18,7 \pm 2,1^{d,e,f}$	$2,3 \pm 0,5^{d,e}$
2	0,1	200	0	10	$19,0 \pm 2,2^{d,e,f}$	$2,4 \pm 0,3^{d,e}$
3	0,1	200	700	10	$20,4 \pm 2,0^{c,d,e,f}$	$2,6 \pm 0,2^{d,e}$
4	0,1	500	450	10	$22,1 \pm 3,3^{b,c,d,e,f}$	$2,8 \pm 0,9^{c,d}$
5	0,04	0	0	10	$17,9 \pm 2,2^{f}$	$2,3 \pm 0,3^{d,e}$
6	0,04	0	700	10	$29,7 \pm 2,6^{a,b}$	$4,6 \pm 0,4^{b}$
7	0,04	200	450	10	$25,6 \pm 3,2^{a,b,c,d,e,f}$	$3,8 \pm 0,5^{b,c}$
8	0,04	500	0	10	$17,0 \pm 3,2^{f}$	$1,7 \pm 0,1^{d,e}$
9	0,04	500	700	10	$26,8 \pm 5,1^{a,b,c,d,e}$	$4,6 \pm 0,2^{b}$
10	0,03	0	450	10	$17,5 \pm 2,5^{e,f}$	$2,7 \pm 0,2^{c,d}$
11	0,03	200	0	10	$26,6 \pm 2,2^{a,b,c,d}$	$1,5 \pm 0,4^{d,e}$
12	0,03	200	700	10	$28,7 \pm 2,4^{a,b,c}$	$1,5 \pm 0,5^{e}$
13	0,03	500	450	10	$34,4 \pm 4,9^{a}$	$6,1 \pm 0,1^{a}$

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

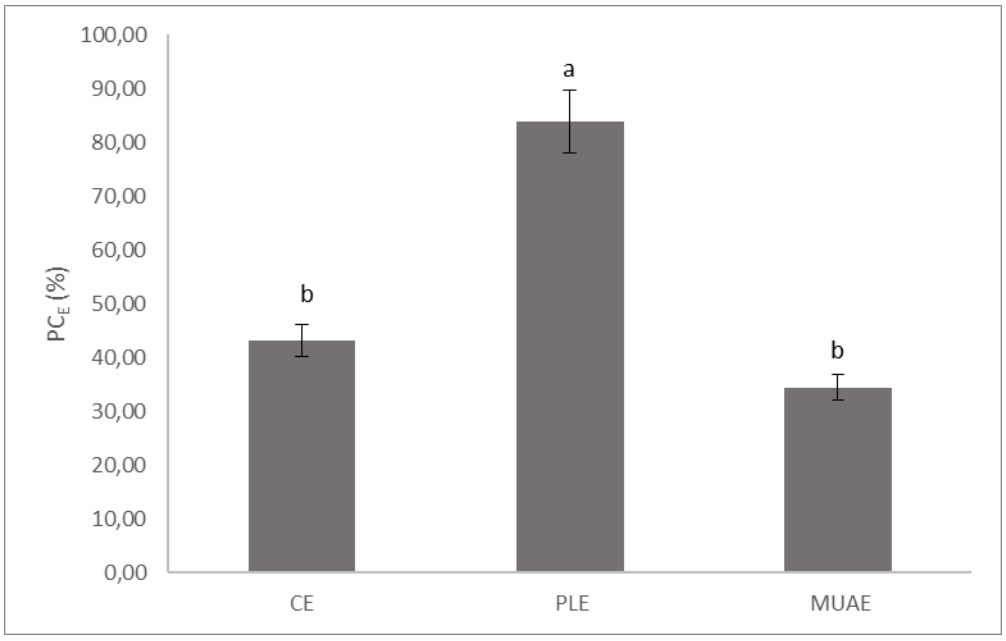
6.3.4 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε pH 8



Διάγραμμα 6.2 Βέλτιστες τιμές PY για κάθε μέθοδο εκχύλισης σε pH 8. Η στατιστική σημαντικότητα (p<0,05) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.2, το μεγαλύτερο PY επιτυγχάνεται μέσω της μεθόδου εκχύλισης με υγρό υπό πίεση. Συγκεκριμένα, το PY που προκύπτει από την υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι 8,3%, ενώ από την συμβατική και την υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους 5,3% και 6,3% αντίστοιχα. Σημασία επίσης έχει το γεγονός ότι η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους απαιτεί την μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη, καθώς το μέγιστο PY λαμβάνεται σε αναλογία στερεού/διαλύτη 0,03 w/v. Έτσι αυξάνεται το κόστος της διεργασίας. Παράλληλα, οι καινοτόμες μέθοδοι αποδίδουν σε μικρότερο χρόνο εκχύλισης από την συμβατική, η οποία πραγματοποιείται σε 2 ώρες σε αντίθεση με την υπερκρίσιμη και την υποβοηθούμενη με μικροκύματα και υπερήχους με 6 και 10 λεπτά αντίστοιχα.

Στο Διάγραμμα 6.3 παρατηρείται ότι μεγαλύτερο PC_E λαμβάνεται επίσης από την εκχύλιση υγρού υπό πίεση. Συγκεκριμένα, το PC_E είναι 75,6 σε αντίθεση με την συμβατική εκχύλιση και την υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους όπου λαμβάνεται 43,2 και 34,4, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6.3 Βέλτιστες τιμές PC_E για κάθε μέθοδο εκχύλισης σε pH 8. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

6.4 Εκχυλίσεις σε pH 11

Γενικά, στην αλκαλική εκχύλιση η απόδοση αυξάνεται με την αύξηση του pH (Buning Zhang et al., 2009). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν σε pH 8 δεν κρίθηκαν ως ικανοποιητικά. Έτσι, ήταν σκόπιμο να πραγματοποιηθούν εκχυλίσεις και σε pH 11, ώστε να γίνει μια σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων σε αυτές τις δύο τιμές pH και να επιβεβαιωθεί ότι η αύξηση του pH θα αυξήσει τις τιμές των μελετώμενων παραμέτρων.

6.4.1 Συμβατική εκχύλιση

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», πραγματοποιήθηκαν συμβατικές εκχυλίσεις με πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό για αναλογίες στερεού/διαλύτη 0,03-0,1 w/v και χρόνους εκχύλισης 30-120 min.

Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης σε pH 11

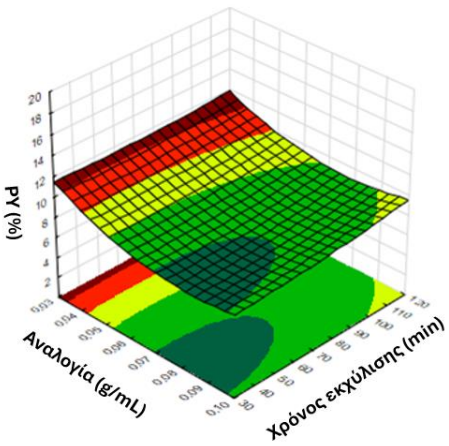
Πείραμα	Αναλογία (g/mL)	Χρόνος (min)	PC_E (mg/g)	PC_P (mg/g)	PY (%)	PR_P (%)	PR_E (%)
1	0,10	30	$80,2 \pm 5,6^{d,e}$	$935,2 \pm 21,3^{a}$	$7,8 \pm 0,3^{e}$	$30,3 \pm 2,0^{c,d}$	$38,6 \pm 1,4^{b,c}$
2	0,10	60	$90,4 \pm 5,9^{c,d}$	$828,4 \pm 17,5^{a,b}$	$10,1 \pm 0,4^{b,c}$	$33,1 \pm 2,2^{c}$	$36,4 \pm 1,7^{c}$
3	0,10	120	$94,6 \pm 5,8^{b,c,d}$	$921,9 \pm 19,4^{a}$	$11,9 \pm 0,5^{a}$	$42,4 \pm 2,6^{a}$	$43,9 \pm 1,8^{b}$

4	0,04	30	112,5 ± 6,9^{a}	689,2 ± 15,8^{b,c}	8,8 ± 0,3^{d,e}	29,7 ± 1,8^{c,d}	42,4 ± 2,1^{b}
5	0,04	60	71,2 ± 5,4^{e}	593,6 ± 16,3^{c}	10,0 ± 0,4^{b,c}	31,5 ± 1,9^{d}	41,8 ± 2,1^{b}
6	0,04	120	107,6 ± 6,8^{a,b,c}	948,1 ± 18,4^{a}	11,0 ± 0,5^{a,b}	41,1 ± 2,5^{b}	49,1 ± 1,9^{a}
7	0,03	30	85,6 ± 5,8^{d,e}	624,8 ± 14,7^{c}	9,3 ± 0,4^{c,d}	26,0 ± 1,7^{d}	39,5 ± 1,6^{b,c}
8	0,03	60	104,2 ± 6,5^{a,b,c}	638,4 ± 15,1^{c}	10,9 ± 0,4^{a,b}	27,3 ± 1,8^{d}	42,1 ± 2,2^{b}
9	0,03	120	109,8 ± 6,6^{a,b}	746,3 ± 12,7^{b,c}	11,8 ± 0,5^{a}	36,3 ± 2,3^{c}	50,3 ± 2,5^{a}

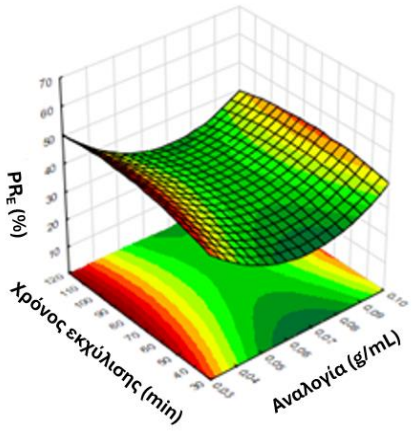
Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Το PY κυμαίνεται από 8,8-11,9% με το πείραμα 3 (0,1 w/v και 120 min) να αποδίδει την μέγιστη απόδοση. Το PR_P λαμβάνει τιμές από 26,0-42,4% όπου το μέγιστο βρίσκεται στο πείραμα 3, ενώ το PR_E από 36,4-50,3% με την μέγιστη τιμή να λαμβάνεται από το πείραμα 9 (0,03w/v και 120 min). Το πείραμα 6 (0,04 w/v και 120 min) λαμβάνεται ως το πείραμα με τις βέλτιστες συνθήκες για την συμβατική εκχύλιση πρωτεΐνης από την βαμβακόπιτα. Το πείραμα 3, παρόλο που εμφανίζει μέγιστη απόδοση (PY) και PR_P, εμφανίζει χαμηλότερο PR_E και το πείραμα 9 παρουσιάζει πολύ χαμηλό PR_P. Φαίνεται ο υψηλός χρόνος εκχύλισης (120 min) να παρουσιάζει σαφώς καλύτερα αποτελέσματα από τους μικρότερους.

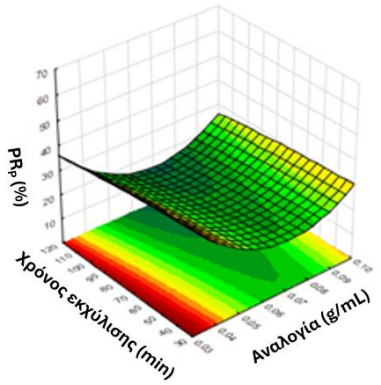
Από την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψαν τα τρισδιάστατα διαγράμματα που αναδεικνύουν την εξάρτηση των αποτελεσμάτων από τις ανεξάρτητες παραμέτρους – αναλογία στερεού/διαλύτη και χρόνο εκχύλισης.



(α)



(β)



(γ)

Διάγραμμα 6.4 PY (α), PR_E (β) και PR_P (γ) συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και χρόνου εκχύλισης για την CE σε pH 11

Όσον αφορά το PY φαίνεται από το διάγραμμα ότι σε αναλογίες μεταξύ 0,03-0,04 w/v οι αποδόσεις είναι μεγαλύτερες, γεγονός που συνάδει με τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς μεγάλες τιμές αποδόσεων βρίσκονται στα πειράματα 6, 8 και 9. Το PR_E φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές σε μικρές αναλογίες και μεγάλους χρόνους εκχύλισης, με το βέλτιστο να βρίσκεται σε αναλογία 0,03 w/v και 120 min, όπως επαληθεύτηκε και πειραματικά από το πείραμα 9. Επίσης το PR_P λαμβάνει μεγαλύτερες τιμές σε αναλογίες μικρότερες από 0,04 w/v και χρόνους εκχύλισης πάνω από 90 min όπως αποτυπώνεται από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το πείραμα 6.

Οι μελέτες που αναφέρονται στην αλκαλική εκχύλιση πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα είναι σχετικά περιορισμένες. Έρευνα που έχει διεξαχθεί, έδωσε σαν αποτέλεσμα PR_E 70% κατά την συμβατική εκχύλιση από βαμβακόπιτα σε συνθήκες pH 12,5, θερμοκρασίας 60◦C και αναλογίας στερεού/υγρού 1/12 w/v για 40 λεπτά (Zhang et al., 2009). Η υψηλότερη ανάκτηση πρωτεΐνης στο εκχύλισμα που παρατηρήθηκε, πιθανότατα οφείλεται στο αυξημένο pH και τη θερμοκρασία.

6.4.2 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση

Η μέθοδος εκχύλισης με υγρό υπό πίεση βελτιστοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψιν τρεις παραμέτρους, την αναλογία στερεού/διαλύτη, τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα για αναλογίες 0,03-0,1 w/v, θερμοκρασίες 50-150°C και χρόνους εκχύλισεις 3-10 min.

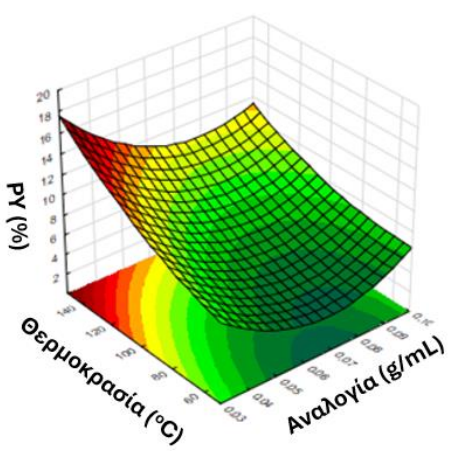
Πίνακας 6.7 Αποτελέσματα εκχύλισης υγρού υπό πίεση σε pH 11

Πείραμα	Ratio (g/mL)	T (°C)	t (min)	PC_E (mg/g)	PC_P (mg/g)	PY (%)	PR_P (%)	PR_E (%)

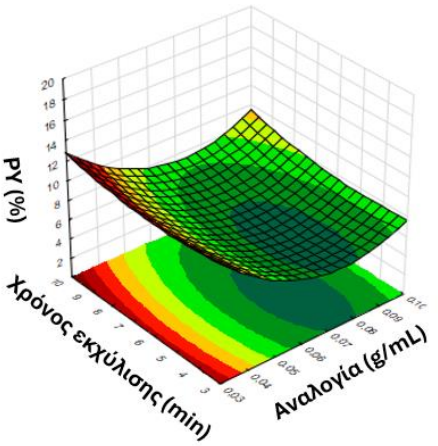
1	0,10	100	3	$87,4 \pm 5,6^{a,b,c}$	$735,7 \pm 17,3^{b}$	$8,6 \pm 0,8^{e,f}$	$25,7 \pm 1,7^{f}$	$39,9 \pm 2,6^{d,e}$
2	0,10	100	10	$93,7 \pm 5,8^{a,b,c}$	$728,4 \pm 15,0^{b}$	$10,2 \pm 0,9^{c,d,e}$	$32,5 \pm 1,9^{e}$	$42,8 \pm 2,5^{c,d,e}$
3	0,10	50	6	$55,3 \pm 3,3^{c}$	$914,8 \pm 18,4^{a}$	$5,5 \pm 0,4^{g}$	$23,4 \pm 1,8^{f,g}$	$25,3 \pm 1,3^{f}$
4	0,10	150	6	$115,7 \pm 6,3^{ab,c}$	$698,3 \pm 16,9^{b}$	$10,6 \pm 0,9^{c,d,e}$	$33,7 \pm 2,1^{e}$	$52,8 \pm 2,7^{c}$
5	0,04	50	3	$95,3 \pm 5,9^{a,b,c}$	$707,2 \pm 16,8^{b}$	$6,7 \pm 0,5^{f,g}$	$20,9 \pm 1,1^{f,g}$	$45,8 \pm 2,6^{c,d}$
6	0,04	50	10	$177,3 \pm 8,6^{a}$	$631,4 \pm 14,0^{b}$	$7,4 \pm 0,5^{f,g}$	$18,5 \pm 0,9^{g}$	$79,0 \pm 5,1^{b}$
7	0,04	100	6	$76,2 \pm 5,2^{b,c}$	$587,8 \pm 15,4^{b}$	$9,1 \pm 0,8^{d,e,f}$	$25,1 \pm 1,2^{f}$	$34,8 \pm 2,5^{e,f}$
8	0,04	150	3	$156,7 \pm 7,8^{a,b}$	$896,3 \pm 18,9^{a}$	$14,9 \pm 1,0^{d,e,f}$	$59,2 \pm 2,7^{b}$	$75,4 \pm 3,4^{b}$
9	0,04	150	10	$205,4 \pm 9,1^{a,b}$	$642,5 \pm 16,1^{b}$	$16,4 \pm 1,1^{d,e,f}$	$43,2 \pm 2,3^{c,d}$	$93,8 \pm 5,8^{a}$
10	0,03	50	6	$43,5 \pm 2,9^{b,c}$	$729,6 \pm 18,2^{b}$	$8,4 \pm 0,7^{b}$	$25,0 \pm 1,1^{f}$	$25,0 \pm 1,1^{f}$
11	0,03	100	3	$97,8 \pm 5,8^{c}$	$839,2 \pm 18,8^{a,b}$	$11,2 \pm 1,0^{a,b}$	$40,1 \pm 2,5^{d}$	$44,6 \pm 2,7^{c,d,e}$
12	0,03	100	10	$110,5 \pm 6,1^{a,b}$	$924,5 \pm 19,1^{a}$	$12,0 \pm 0,9^{e,f}$	$49,0 \pm 2,6^{c}$	$50,5 \pm 3,1^{c}$
13	0,03	150	6	$198,1 \pm 8,7^{a}$	$889,1 \pm 17,7^{a}$	$18,7 \pm 1,2^{c,d}$	$74,8 \pm 3,1^{a}$	$85,5 \pm 5,9^{a,b}$

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

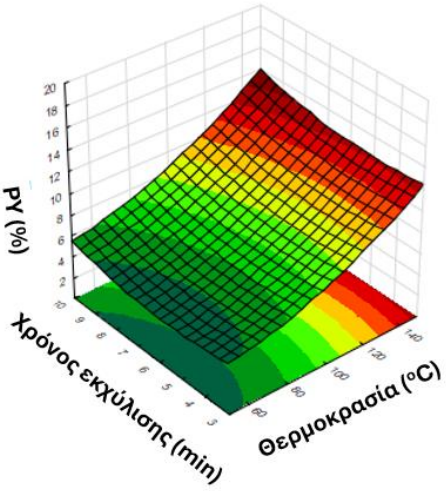
Οι τιμές του PY και του PR_P κυμαίνονται από 5,5-18,7% και 18,5-74,8% αντίστοιχα με τις βέλτιστες τιμές να λαμβάνονται από το πείραμα 13 (0,03 w/v, 150 °C και 6 min). Οι τιμές του PR_E βρίσκονται στο διάστημα 25,0-93,8% όπου το μέγιστο αποτελέσμα βρίσκεται στο πείραμα 9 (0,04 w/v, 150 °C και 10 min). Ως βέλτιστο σημείο της συγκεκριμένης μεθόδου εκχύλισης λαμβάνεται το πείραμα 13, εμφανίζοντας τις μέγιστες τιμές των PY και PR_P. Παρόλο που στο πείραμα 9 λήφθηκε το μέγιστο PR_E, σε αυτές τις συνθήκες ήταν μικρότερο το PY και σαφώς μικρότερη η τιμή του PR_P, με το πείραμα 13 να παρουσιάζει πιο σταθμισμένες τιμές για τις μεταβλητές αριστοποίησης.



(α)



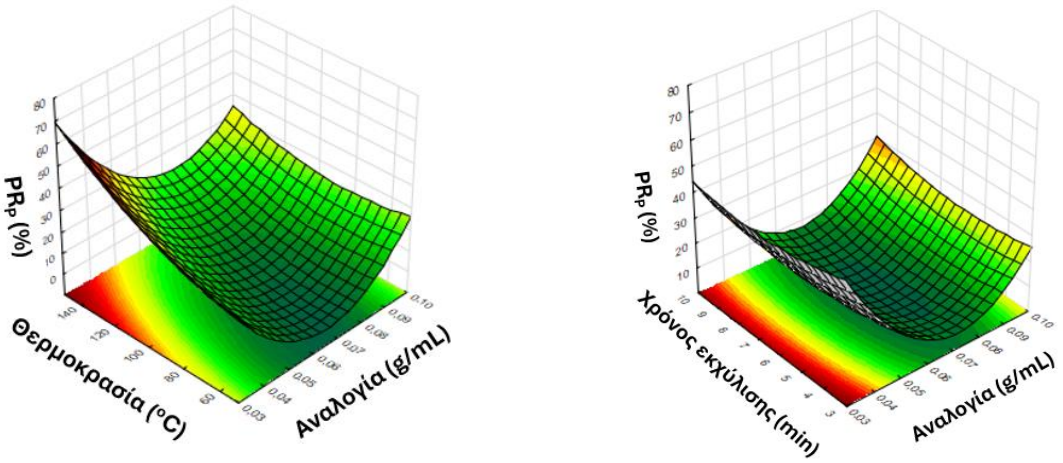
(β)



(γ)

Διάγραμμα 6.5 (α) PY συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας, (β) PY συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας και (γ) PY συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας για την PLE σε pH 11

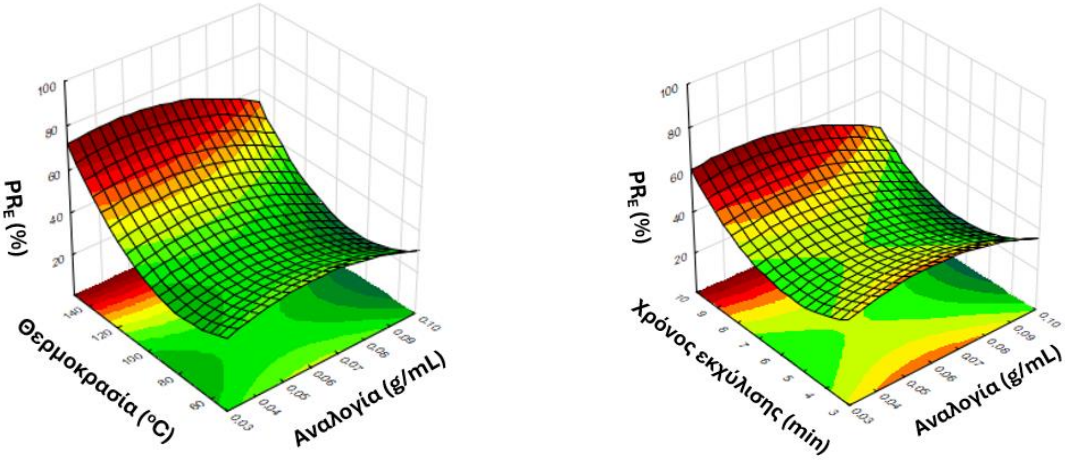
Όπως φαίνεται από τα τρισδιάστατα διαγράμματα η αποδόση της εκχύλισης (PY) αυξάνεται σε θερμοκρασίες πάνω από 120 °C, αναλογίες στερεού/διαλύτη μικρότερες από 0,04 w/v και μεσαίο χρόνο εκχύλισης, γεγονός που πιστοποιείται και από τα πειραματικά αποτελέσματα όπου αναδείχθηκε μέγιστη στο πείραμα 13.



(α) (β)

Διάγραμμα 6.6 (α) PR_P συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας και (β) PR_P συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την PLE σε pH 11

Η ανάκτηση της πρωτεΐνης στο τελικό καταβυθιζούμενο στερεό φαίνεται να ευνοείται σε θεμοκρασία άνω των 130°C, αναλογίες μικρότερες από 0,04 w/v και μεσαίο χρόνο εκχύλισης. Τα πειραματικά δεδομένα συμπύπτουν ξεκάθαρα με αυτή την διαπίστωση καθώς η τιμή του PR_P στο πείραμα 13 απέχει κατά σημαντικό βαθμό από την αμέσως μικρότερη, η οποία απαντάται στο πείραμα 8 (0,04 w/v, 150 °C, 3 min).



(α) (β)

Διάγραμμα 6.7 (α) PR_E συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και θερμοκρασίας και (β) PR_E συναρτήσει χρόνου εκχύλισης και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την PLE σε pH 11

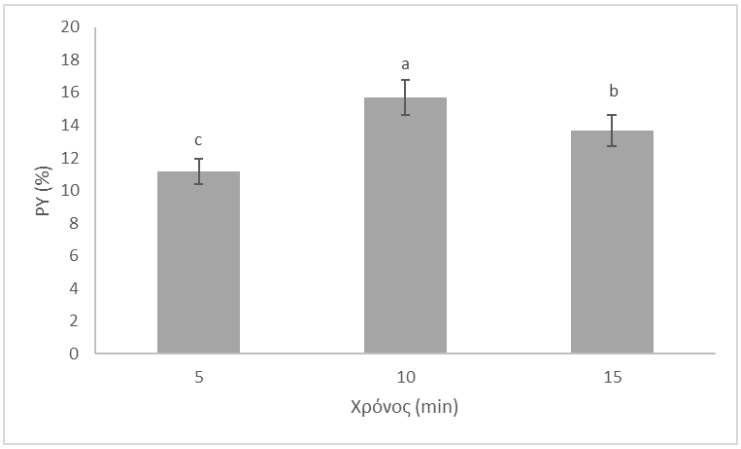
Στο Διάγραμμα 6.7 παρουσιάζεται η εξάρτηση της ανάκτησης πρωτεΐνης στο εκχύλισμα από τις παραμέτρους που διέπουν την διεργασία. Η συγκεκριμένη παράμετρος φαίνεται να βελτιστοποιείται σε μεσαίες αναλογίες και υψηλή θερμοκρασία και χρόνο εκχύλισης. Παρόλα αυτά επιλέχθηκε συνόλικα ως βέλτιστο το πείραμα στο οποίο παρουσίαζε την αμέσως μικρότερη τιμή της, διότι το πείραμα 9 δεν παρουσίαζε μεγάλη ανάκτηση πρωτεΐνης στην καταβύθιση.

Γενικά, οι υψηλές θερμοκρασίες ενισχύουν την ανάκτηση πρωτεϊνών βελτιώνοντας τις ιδιότητες του διαλύτη και επιταχύνοντας τη μεταφορά μάζας. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση του νερού μειώνονται, επιτρέποντας καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα. Αυτό προάγει την πιο αποτελεσματική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν τους ρυθμούς διάχυσης και μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη ισορροπίας εκχύλισης.

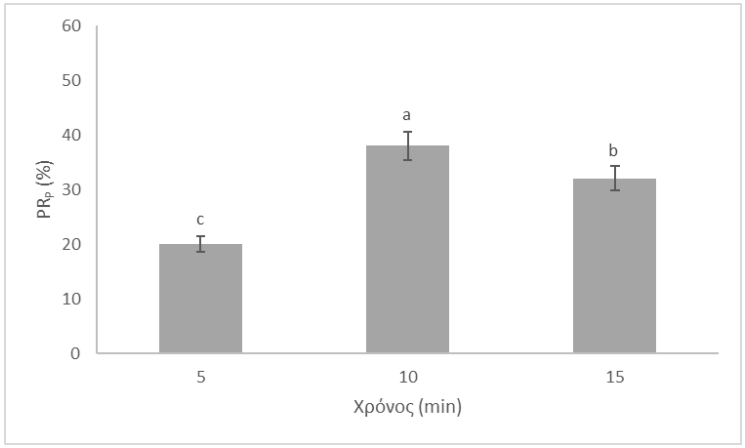
Όσον αφορά άλλες μελέτες, έχει βρεθεί ανάκτηση πρωτεΐνης στο εκχύλισμα 35,4-52,4% από σπόρους κόκκινης πιπεριάς, γεγονός που τονίζει τις υψηλές τιμές PR_E που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας (Firatligil-Durmus et al., 2010). Συνεπώς, η εκχύλιση υγρού υπό πίεση συνιστά καινοτόμο μέθοδο εκχύλισης που ενισχύει τόσο την απόδοση όσο και την ανάκτηση πρωτεΐνης σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα σχετικά με την συμβατική μέθοδο. Οι μικρές αναλογίες και η υψηλή θερμοκρασία απαιτούν οικονομική επένδυση λόγω της ανάγκης για μεγάλες ποσότητες διαλύτη και υψηλή παροχή θερμότητας, αλλά η συγκεκριμένη τεχνολογία εκχύλισης ενισχύει σε σημαντικό βαθμό την διεργασία.

6.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους

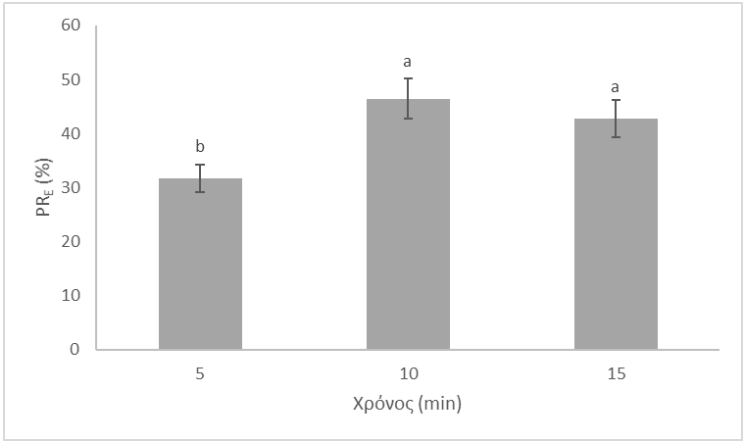
Αρχικά προσδιορίστηκε η επίδραση του χρόνου στην εκχύλιση πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 3 τιμές χρόνου (5, 10 και 15 λεπτά) σε σταθερές συνθήκες και συγκεκριμένα αναλογία 0,04 w/v και ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων 200 και 450 W αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.6 οι τιμές των PY, PR_P και PR_E μεγιστοποιούνται σε χρόνο 10 λεπτών. Συνεπώς οι εκχυλίσεις με χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων πραγματοποιήθηκαν σε χρόνο 10 λεπτών με μεταβλητές αναλογίες στερεού/διαλύτη από 0,03-0,1 w/v, ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων από 200-500 W και 450-700 W αντίστοιχα.



(α)



(β)



(γ)

Διάγραμμα 6.8 Επίδραση του χρόνου στις τιμές των PY (α), PR_P (β) και PR_E (γ) για την MUAE σε pH 11. Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

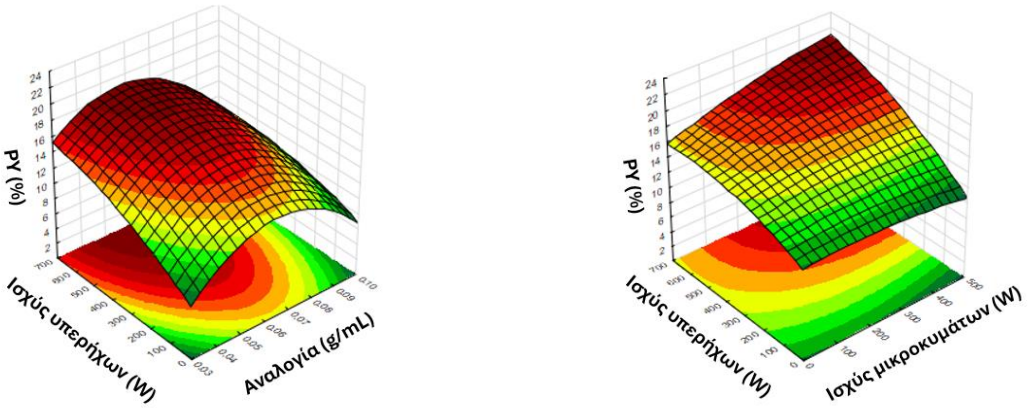
Πίνακας 6.8 Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα και υπερήχους σε pH 11

Πείραμα	Ratio (g/mL)	MW (W)	US (W)	PC_E (mg/g)	PC_P (mg/g)	PY (%)	PR_P (%)	PR_E (%)
1	0,10	0	450	$57,6 \pm 3,3^{c,d,e}$	$623,6 \pm 15,3^{b}$	$7,9 \pm 0,7^{f,g}$	$25,1 \pm 1,4^{d,e}$	$29,3 \pm 1,5^{d,e}$
2	0,10	200	0	$50,9 \pm 3,2^{d,e,f}$	$616,3 \pm 16,0^{b}$	$7,3 \pm 0,7^{g}$	$18,9 \pm 1,1^{f}$	$23,2 \pm 1,3^{f,g}$
3	0,10	200	700	$61,2 \pm 3,4^{b,c,d}$	$598,1 \pm 15,8^{b}$	$10,4 \pm 1,0^{d,e,f}$	$23,1 \pm 1,3^{d,e,f}$	$28,0 \pm 1,6^{d,e,f}$
4	0,10	500	450	$70,0 \pm 3,8^{b}$	$541,8 \pm 14,5^{b}$	$11,1 \pm 0,9^{c,d,e}$	$27,0 \pm 1,5^{c,d}$	$32,0 \pm 1,7^{c,d}$
5	0,04	0	0	$50,7 \pm 3,6^{e,f}$	$486,2 \pm 16,9^{b}$	$8,7 \pm 0,8^{e,f,g}$	$12,4 \pm 0,7^{g}$	$20,1 \pm 1,3^{g}$
6	0,04	0	700	$54,8 \pm 3,5^{c,d,e,f}$	$392,7 \pm 15,4^{b}$	$14,4 \pm 1,0^{a,b}$	$25,0 \pm 1,3^{d,e}$	$31,5 \pm 2,0^{c,d,e}$
7	0,04	200	450	$101,6 \pm 6,0^{a}$	$539,1 \pm 15,8^{b}$	$15,7 \pm 1,1^{a}$	$38,0 \pm 2,1^{a}$	$46,4 \pm 2,5^{a}$
8	0,04	500	0	$45,4 \pm 3,1^{f}$	$627,5 \pm 16,2^{b}$	$8,1 \pm 0,8^{f,g}$	$20,8 \pm 1,2^{e,f}$	$35,9 \pm 2,1^{b,c}$
9	0,04	500	700	$61,5 \pm 3,3^{b,c}$	$148,2 \pm 9,9^{c}$	$20,4 \pm 1,4^{a}$	$12,5 \pm 0,8^{g}$	$28,1 \pm 1,8^{d,e,f}$
10	0,03	0	450	$62,2 \pm 3,4^{b,c}$	$746,7 \pm 17,4^{a}$	$12,5 \pm 0,9^{b,c,d}$	$30,5 \pm 1,6^{b,c}$	$38,0 \pm 2,2^{b}$
11	0,03	200	0	$31,9 \pm 2,6^{f}$	$522,4 \pm 15,1^{b}$	$7,3 \pm 0,7^{g}$	$20,9 \pm 1,2^{e,f}$	$26,2 \pm 1,4^{e,f}$
12	0,03	200	700	$80,8 \pm 5,3^{a}$	$633,6 \pm 15,3^{b}$	$13,6 \pm 1,1^{a,b,c}$	$30,3 \pm 1,6^{b,c}$	$36,9 \pm 2,1^{b,c}$
13	0,03	500	450	$100,2 \pm 5,9^{a}$	$641,8 \pm 16,5^{b}$	$14,2 \pm 1,2^{a,b}$	$32,5 \pm 1,5^{b}$	$45,7 \pm 2,2^{a}$

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι οι τιμές των αποδόσεων κυμαίνονται από 7,3 έως 20,4 % όπου η μέγιστη τιμή λαμβάνεται από το πείραμα 11 (0,04 w/v, 500 W μικροκυμάτων, 700 W υπερήχων). Το PR_P και PR_E κυμαίνεται μεταξύ 12,4-38,0% και μεταξύ 20,1-46,4% αντίστοιχα, με τις μέγιστες τιμές τους να βρίσκονται στο πείραμα 7 (0,04 w/v, 200 W μικροκυμάτων, 450 W υπερήχων).

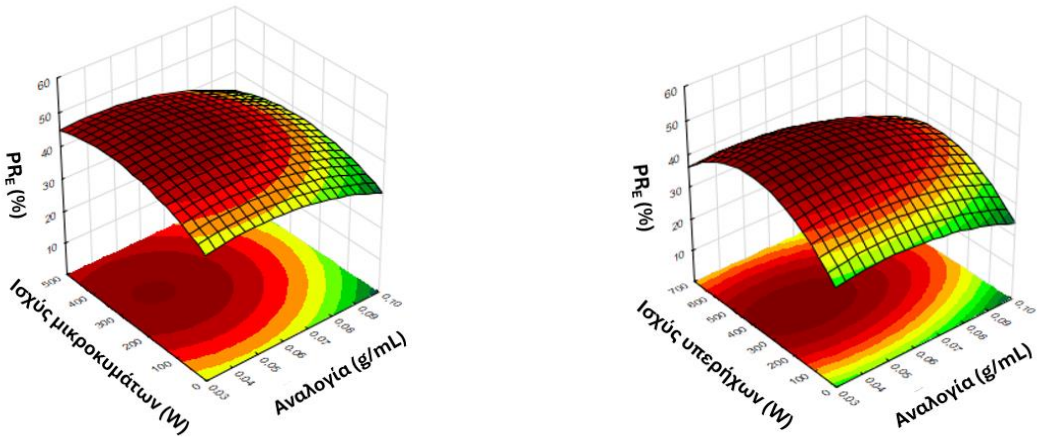
Τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονται στις συνθήκες που διενεργείται το πείραμα 7. Η απόδοση λαμβάνει την μέγιστη τιμή της στο πείραμα 11, αλλά στις συγκεκριμένες συνθήκες οι ανακτήσεις των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα και στο καταβυθιζούμενο στερεό είναι μικρές και έτσι επιλέγεται το πείραμα με την αμέσως μικρότερη τιμή του PY όπου και μεγιστοποιούνται τα PR_P και PR_E.



(α) (β)

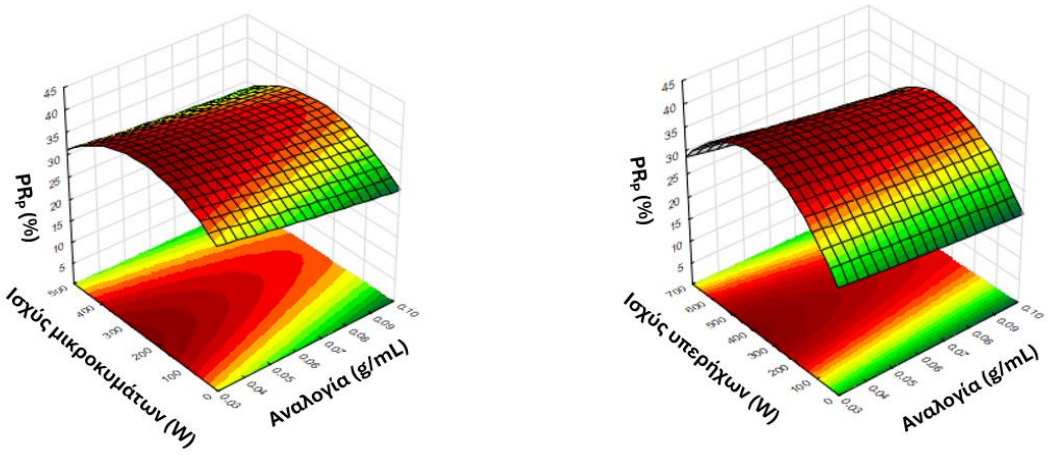
Διάγραμμα 6.9 (α) PY συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος υπερήχων και (β) PY συναρτήσει ισχύος υπερήχων και μικροκυμάτων για την MUAE σε pH 11

Το Διάγραμμα 6.9 παρουσιάζει την εξάρτηση της απόδοσης από τις ανεξάρτητες παραμέτρους της διεργασίας. Ειδικότερα η απόδοση φαίνεται να αυξάνεται σε μεσαίες αναλογίες στερεού/διαλύτη και μεσαίες τιμές ισχύος μικροκυμάτων και υπερήχων, ακολουθώντας και τα πειραματικά αποτελέσματα όπου το μέγιστο εμφανίστηκε στο πείραμα 11.



(α) (β)

Διάγραμμα 6.10 (α) PR_E συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος μικροκυμάτων και (β) PR_E συναρτήσει αναλογίας και ισχύος υπερήχων για την MUAE σε pH 11



(α) (β)

Διάγραμμα 6.11 (α) PR_P συναρτήσει αναλογίας στερεού/διαλύτη και ισχύος μικροκυμάτων και (β) PR_P συναρτήσει ισχύος υπερήχων και αναλογίας στερεού/διαλύτη για την MUAE σε pH 11

Από τα Διαγράμματα 6.10 και 6.11 φαίνεται το PR_P και PR_E να παρουσιάζουν όμοια τάση όσον αφορά την αναλογία στερεού/διαλύτη και την ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων. Οι τιμές αυτές αυξάνονται σε μεσαία αναλογία και μεσαία ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων.

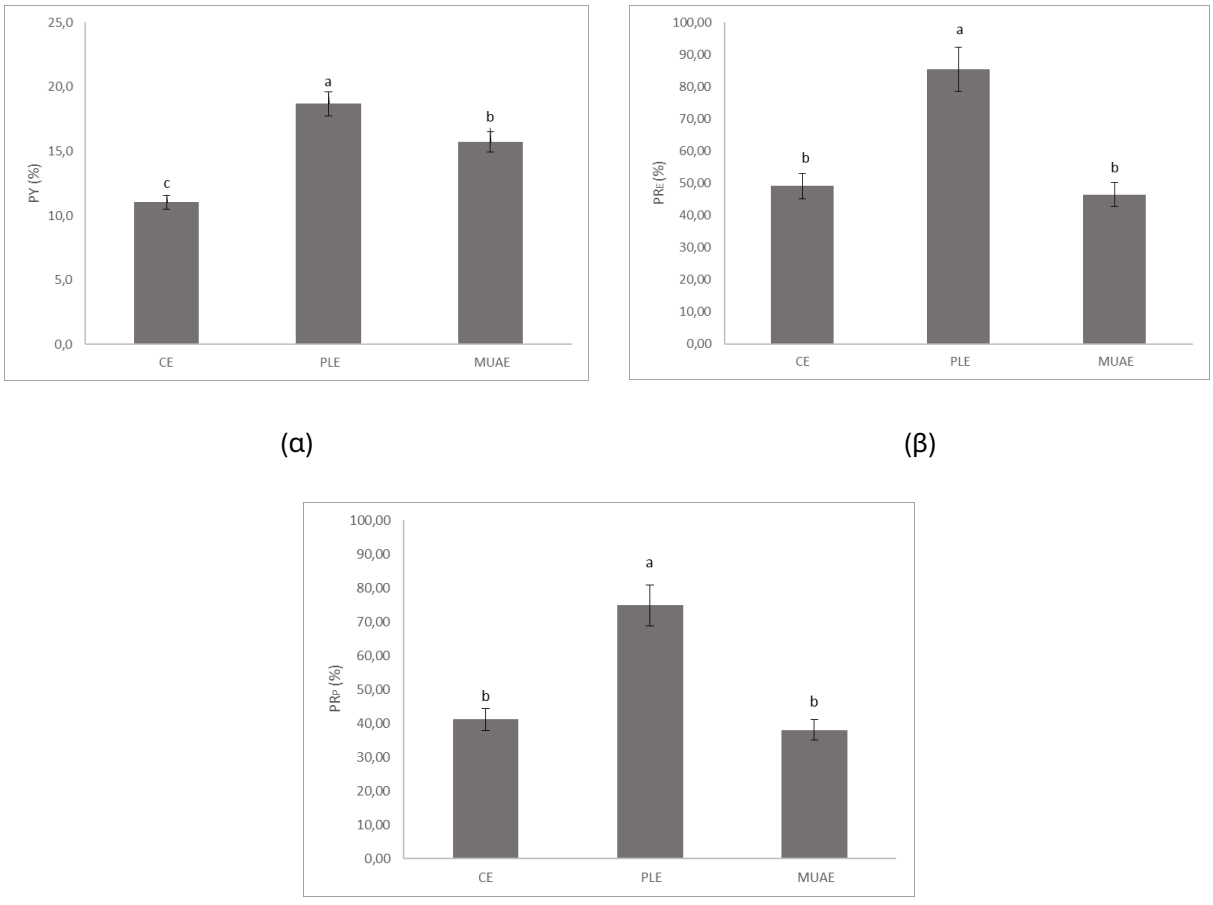
Η εφαρμογή υπερήχων και μικροκυμάτων επηρεάζει θετικά τόσο την εκχύλιση όσο και την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ο μηχανισμός που διέπει την εκχύλιση με χρήση υπερήχων οφείλεται κυρίως στην σπηλαίωση, μέσω της οποίας παράγεται ενέργεια μέσα στο μέσο. Ομοίως, τα μικροκύματα παρέχουν ενέργεια μέσω της παραγωγής θερμότητας, που διευκολύνεται από την περιστροφή διπόλου και την ιοντική αγωγιμότητα. Αυτοί οι μηχανισμοί συμβάλλουν στη διάσπαση του φυτικού ιστού, ενισχύοντας έτσι τη διείσδυση του διαλύτη μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Κατά συνέπεια, αυτές οι διεργασίες διευκολύνουν την απελευθέρωση συστατικών της κυτταρικής μήτρας και βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς μάζας.

Χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων έχει γίνει και σε άλλες μελέτες που αφορούν την εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς σπόρους. Η εφαρμογή υπερήχων κατά την αλκαλική εκχύλιση από πίτα κολοκυθόσπορου έδωσε ως αποτέλεσμα PR_P 57,8%, όπου η ισχύς των υπερήχων ανερχόταν σε 600 W (Rohm et al., 2022). Επίσης, κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενης από μικροκύματα από σόγια λήφθηκε PR_P έως και 77,8% (Choirun et al., 2025). Οι παραπάνω σπόροι αποτελούν διαφορετική πρώτη ύλη από την βαμβακόπιτα με τα δικά τους φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο φαίνεται η ευρεία χρήση υπερήχων και μικροκυμάτων κατά την εκχύλιση πρωτεϊνών ενισχύοντας την διεργασία και λαμβάνοντας υπόψιν περιβαλλοντικές και οικονομικές παράμετρους αφού πρόκειται για μια «πράσινη» τεχνολογία εκχύλισης.

Συμπερασματικά η συγκεκριμένη τεχνολογία εκχύλισης ευνοείται σε μεσαία αναλογία (0,04 w/v) και μεσαίες τιμές ισχύος μικροκυμάτων και υπερήχων (200 και 450 W αντίστοιχα), σε εκχυλίσεις των 10

λεπτών. Με αυτό τον τρόπο δεν απαιτούνται υψηλά ενεργειακά κόστη, χωρίς ανάγκη για μεγάλες ποσότητες διαλύτη, και η διεργασία καθίσταται αποδοτική.

6.4.4 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε pH 11



(α) (β)

(γ)

Διάγραμμα 6.12 Σύγκριση PY (α), PR_E (β) και PR_P (γ) βέλτιστων συνθηκών μεταξύ των μεθόδων σε pH 11. Η στατιστική σημαντικότητα (p<0,05) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Πίνακας 6.9 Αποτελέσματα κάθε μεθόδου εκχύλισης στις βέλτιστες συνθήκες

Βέλτιστα αποτελέσματα	Ratio (g/mL)	t (min)	T (°C)	MW (W)	US (W)	PC_E (mg/g)	PC_P (mg/g)	PY (%)	PR_E (%)	PR_P (%)
CE	0,04	120	25	0	0	$107,6 \pm 6,8^b$	$948,1 \pm 18,4^a$	$11,0 \pm 0,5^b$	$49,1 \pm 1,9^b$	$41,1 \pm 2,5^b$
PLE	0,03	6	150	0	0	$198,1 \pm 8,7^a$	$889,1 \pm 17,7^a$	$18,7 \pm 1,2^a$	$85,5 \pm 5,9^a$	$74,8 \pm 3,1^a$

MUAE	0,04	10	40	200	450	101,6 ± 6[b]	539,1 ± 15,8[b]	15,7 ± 1,1[c]	46,4 ± 2,5[b]	38,0 ± 2,1[b]

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

Από τον Πίνακα 6.9 φαίνεται ότι η συμβατική εκχύλιση και η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους παρουσιάζουν τα βέλτιστα αποτελέσματα σε αναλογία στερεού/διαλύτη 0,04 w/v και η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση σε αναλογία 0,03 w/v. Οι μικρές αναλογίες απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη, γεγονός που οδηγεί σε μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης στον διαλύτη. Αυτή η βαθμίδα συγκέντρωσης που δημιουργείται ευνοεί την μεταφορά μάζας και συγκεκριμένα πρωτεΐνης από την πρώτη ύλη στον διαλύτη. Ωστόσο οι μεγάλες ποσότητες διαλύτη αυξάνουν το κόστος της διεργασίας. Επίσης, κατά την εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους υπάρχει η ανάγκη για παροχή ψυκτικού υγρού ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται στους 40°C. Αυτό αυξάνει επίσης το κόστος της συγκεκριμένης διεργασίας.

Από το Διάγραμμα 6.12 φαίνεται ότι η εκχύλιση υγρού υπό πίεση παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές σε όλες τις μελετώμενες παραμέτρους. Το PY ήταν 18,7% συγκριτικά με το 15,7% και 11,0% της υποβοηθούμενης με μικροκύματα και υπερήχους και της συμβατικής, αντίστοιχα. Επίσης, έδωσε ως αποτελέσμα 85,5% και 74,8% σε PR_E και PR_P, αντίστοιχα. Μέσω της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάστηκαν καλύτερα αποτελέσματα από την υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους σε PR_E και PR_P, με τιμές 49,13% έναντι του 46,4% και 41,14% έναντι του 46,4%, αντίστοιχα.

Οι καινοτόμες μέθοδοι, ακόμη, παρουσίασαν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από την συμβατική εκχύλιση. Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση διήρκησε 6 λεπτά, η υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους 10 λεπτά, ενώ η συμβατική 2 ώρες.

Συγκεντρωτικά όλες οι μέθοδοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η συμβατική εκχύλιση αποτελεί μία απλή μέθοδο εκχύλισης στον χειρισμό και έχει μικρά κόστη εξοπλισμού, αλλά δίνει μέτρια αποτελέσματα σε μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους απαιτεί μεγαλύτερο κόστος εξοπλισμού, προσφέροντας λίγο μικρότερα αποτελέσματα στο PR_E και PR_P και μεγαλύτερο PY σε πολύ μικρότερο χρόνο εκχύλισης. Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση έχει αυξημένα κόστη λόγω του εξοπλισμού, της υψηλής παροχής θερμότητας και πίεσης και της ανάγκης για μεγάλες ποσότητες διαλύτη, αλλά παρέχει καλύτερα αποτελέσματα σε όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν στον μικρότερο χρόνο και κρίνεται η καλύτερη μέθοδος για βιομηχανικές εφαρμογές. Συνεπώς, η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση κρίνεται ως η βέλτιστη μέθοδος για την ανάκτηση πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα.

6.4.5 Ενζυμική προκατεργασία

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλιο «Υλικά και Μέθοδοι», πραγματοποιείται εκχύλιση υγρού υπό πίεση, αλλά με ενζυμική προκατεργασία της πρώτης ύλης (E-PLE). Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης που μελετήθηκε και επιδιώχθηκε η περαιτέρω αύξηση των μελετώμενων παραμέτρων μέσω της συγκεκριμένης προκατεργασία.

Πίνακας 6.10 Αποτελέσματα ενζυμικής προκατεργασίας

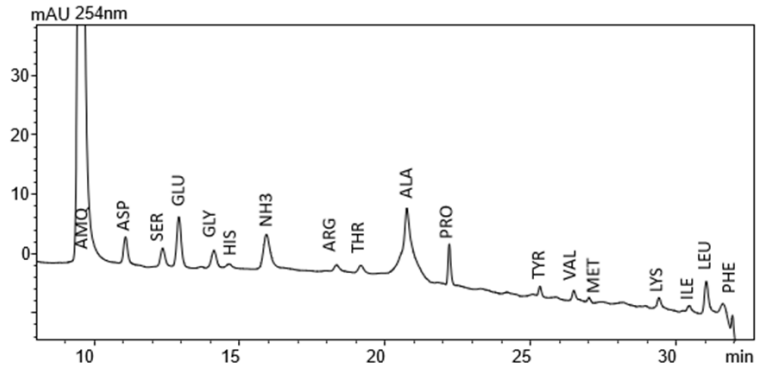
Πείραμα	PC_E (mg/g)	PC_P (mg/g)	PY (%)	PR_E (%)	PR_P (%)
PLE	198,1	889,1	18,7	85,5	74,8
E-PLE	209,8	832,4	21,7	95,8	64,7

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.10, η ενζυμική προκατεργασία φαίνεται να ενίσχυσε την διεργασία της εκχύλισης, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο και PR_E από την εκχύλιση χωρίς ένζυμο. Επίσης, παρουσίασε μεγαλύτερο PY, αλλά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τελικού στερεού είναι μικρότερο όπως και το PR_P. Το χαμηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο δείχνει την πιθανή καταβύθιση και άλλων ουσιών, όπως άλατα, παράλληλα με τις πρωτεΐνες. Συνεπώς το ένζυμο φαίνεται να ενισχύει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και να αυξάνει την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης στον διαλύτη και στο τέλος λαμβάνεται μεγαλύτερη ποσότητα στερεού με μικρότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

Γενικά οι πρωτεάσες διευκολύνουν την εκχύλιση πρωτεϊνών μέσω πρωτεόλυσης. Δεδομένου ότι η διπλωματική εργασία εστιάζει στην αλκαλική εκχύλιση πρωτεϊνών, για τα πειράματα επιλέχθηκε μια αλκαλική πρωτεάση που προέρχεται από το A. saitoi. Η προσθήκη πρωτεάσης μπορεί να ενισχύσει την αλκαλική εκχύλιση μειώνοντας το μέγεθος της πρωτεΐνης και καθιστώντας την εκχύλιση πιο αποτελεσματική. Μελέτη που έχει διεξαχθεί, εξέτασε την εκχύλιση πρωτεΐνης από πίτες ελαιοκράμβης, σόγιας και μικροφυκών χρησιμοποιώντας την αλκαλική πρωτεάση Protex 5L (Sari et al., 2013). Τα ευρήματά τους δείχνουν ότι ενώ το ένζυμο έχει μικρή επίδραση στην εκχύλιση άλευρων σόγιας, επηρεάζει θετικά την εκχύλιση πρωτεΐνης από ελαιοκράμβη και μικροφύκη. Σε άλλη μελέτη, η χρήση αλκαλάσης αύξησε σημαντικά την απόδοση πρωτεΐνης από πίτουρο σουσαμιού στο 79,3%, σε σύγκριση με 24,5% που επιτυγχάνεται με συμβατική εκχύλιση. Επιπλέον, ο συνδυασμός εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων και υπερήχων οδήγησε στην υψηλότερη απόδοση (87,9%) (Bircan et al., 2019).

6.5 Σύνθεση αμινοξέων απομονωμένων πρωτεϊνών στις βέλτιστες συνθήκες

Η σύνθεση αμινοξέων, που προέκυψε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αναδεικνύει την παρουσία απαραίτητων και μη απαραίτητων αμινοξέων στις απομονωμένες πρωτεΐνες.



Εικόνα 6.1 Χρωματογράφημα HPLC της σύνθεσης αμινοξέων των απομονωμένων πρωτεϊνών βαμβακόπιτας

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.1, ανιχνεύθηκε ασπαρτικό οξύ (ASP), σερίνη (SER), γλουταμικό οξύ (GLU), γλυκίνη (GLY), ιστιδίνη (HIS), αργινίνη (ARG), θρεονίνη (THR), αλανίνη (ALA), προλίνη (PRO), θυροσίνη (TYR), βαλίνη (VAL), μεθειονίνη (MET), λυσίνη (LYS), ισολευκίνη (ILE), λευκίνη (LEU) και φαινυλαλανίνη (PHE).

Πίνακας 6.11 Συγκέντρωση αμινοξέων (mg/g προϊόντος) σε κάθε μέθοδο εκχύλισης pH 11

Αμινοξέα	Συμβατική	MUAE	PLE
Asp	115,2	117,9	111,5
Ser	44,5	46	41,8
Glu	186,5	190	181,8
Gly	40,2	41,5	38,1
His	23	24,1	21
Arg	88,1	90,9	84,6
Thr	37,1	38,8	34,7
Ala	46,8	48,5	44,3
Pro	59	60,9	55,7
Tyr	28,9	30,6	26,2
Val	53,2	55	50,3
Met	13,4	14,6	10,8
Lys	67,5	71	60
Ile	41,2	42,8	38,7
Leu	80,3	82,9	76,6
Phe	40,6	42,2	38

Στον Πίνακα 6.11 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των αμινοξέων του τελικού προϊόντος από τις βέλτιστες συνθήκες κάθε τεχνολογίας εκχύλισης. Τα αμινοξέα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαίνεται να είναι το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ και η αργινίνη, ενώ αυτά με την μικρότερη η μεθειονίνη και η ιστιδίνη. Συγκεκριμένα το ασπαρτικό οξύ βρίσκεται σε συγκέντρωση 11,52%, το γλουταμικό 18,65% και η αργινίνη σε 8,81, ενώ η μεθειονίνη είναι σε 1,34% και η ιστιδίνη στο 2,10%. Τα δεδομένα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές (Dabbour et al., 2023). Επίσης, ανιχνεύθηκαν 8 απαραίτητα αμινοξέα σε συνολικό ποσοστό 41,7%, πολύ μεγαλύτερο του 29% που προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (2007).

Το προφίλ αμινοξέων που προέκυψε επιβεβαιώνει τη συνέπεια της θρεπτικής αξίας των απομονωμένων πρωτεϊνών της βαμβακόπιτας με αυτή που έχει βρεθεί σε προηγούμενες έρευνες. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα αυτών των μεθόδων εκχύλισης, καθιστώντας τες πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις για εφαρμογές σε τρόφιμα, ζωοτροφές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

6.6 Χρωματομετρία

Πίνακας 6.12 Τιμές χρώματος των δειγμάτων σε βέλτιστες συνθήκες

	L	a	b
pH 8			
CE	15,40 ± 0,17^{b}	10,11 ± 0,14^{a}	6,92 ± 0,16^{a}
PLE	16,80 ± 0,24^{a}	8,71 ± 0,59^{b}	7,62 ± 0,47^{a}
MUAE	16,40 ± 0,06^{a}	9,83 ± 0,09^{a}	7,46 ± 0,08^{a}
pH 11			
CE	11,54 ± 0,22^{d}	8,22 ± 0,33^{b}	4,36 ± 0,24^{c}
PLE	11,98 ± 0,05^{c}	6,41 ± 0,23^{c}	4,05 ± 0,26^{c}
MUAE	19,24 ± 0,05^{a}	11,81 ± 0,07^{a}	9,44 ± 0,17^{a}
E-PLE	15,55 ± 0,04^{b}	8,33 ± 0,16^{b}	6,57 ± 0,14^{b}

Η στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$) υποδεικνύεται από διαφορετικά γράμματα.

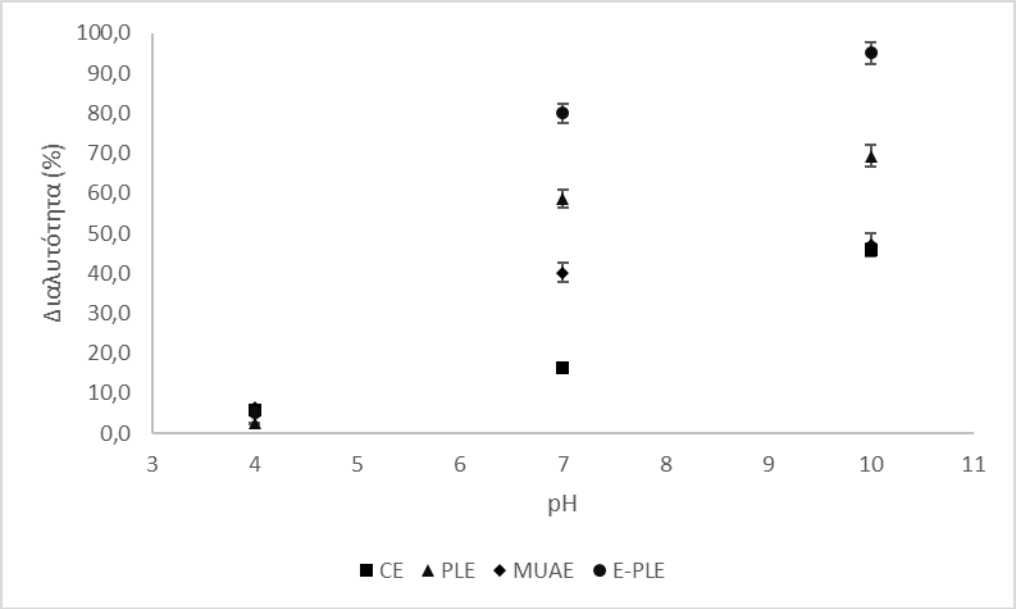
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρωματομετρία σύμφωνα με το σύστημα CIELAB, παρατίθενται στον Πίνακα 6.12. Συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ pH 8 και 11, παρατηρείται ότι στην συμβατική εκχύλιση και στην εκχύλιση με υγρό υπό πίεση οι τιμές των συντελεστών μειώνονται με την αύξηση του pH στην εκχύλιση. Έτσι με την αύξηση του pH, το προϊόν γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο και αποκτά πιο έντονα την πράσινη και μπλε απόχρωση. Αντιθέτως, όσον αφορά την εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους οι συντελεστές αυξάνονται και το προϊόν γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο και αποκτά πιο αισθητά το κόκκινο και το κίτρινο χρώμα.

Μεταξύ των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν σε pH 11, μεγαλύτερες τιμές στους συντελεστές λαμβάνει το προϊόν της εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους και συνεπώς είναι πιο ανοιχτόχρωμο με πιο έντονη την κόκκινη και κίτρινη απόχρωση.

Επίσης, μεταξύ της ενζυμικής προκατεργασίας και της εκχύλισης χωρίς ένζυμο στην εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, φαίνεται το δείγμα της ενζυμικής να είναι πιο ανοιχτόχρωμο με πιο έντονο το κόκκινο και κίτρινο χρώμα.

6.7 Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα σε διάφορες τιμές pH είναι ένας βασικός δείκτης μετουσίωσης πρωτεϊνών λόγω φυσικών ή/και χημικών επεξεργασιών, η οποία μπορεί να επηρεάσει την τεχνολειτουργικότητά τους και την πιθανή εφαρμογή τους σε προϊόντα τροφίμων.



Διάγραμμα 6.13 Διαλυτότητα πρωτεϊνών κάθε μεθόδου εκχύλισης σε διάφορα pH

Στο Διάγραμμα 6.13 παρουσιάζεται η διαλυτότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών, όπως προσδιορίστηκε για κάθε μέθοδο εκχύλισης, σε τιμές pH 4, 7 και 10. Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά: ελάχιστη διαλυτότητα στο pH 4, το οποίο βρίσκεται πλησίον του ισοηλεκτρικού σημείου, αυξημένη διαλυτότητα στο pH 7, και μέγιστη τιμή στο pH 10. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα των Dabbour et al. (2023).

Όσον αφορά τη σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης, η υψηλότερη διαλυτότητα καταγράφηκε στην εκχύλιση με υγρό υπό πίεση σε συνδυασμό με ενζυμική προκατεργασία, ενώ η χαμηλότερη τιμή αντιστοιχούσε στη συμβατική εκχύλιση. Ενδιάμεσες τιμές παρουσίασαν οι μέθοδοι εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους, με καλύτερη απόδοση σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο αλλά χαμηλότερη σε σχέση με την εκχύλιση με υγρό υπό πίεση. Συνεπώς, οι καινοτόμες τεχνικές εκχύλισης συμβάλλουν ουσιαστικά στη βελτίωση της διαλυτότητας των απομονωμένων πρωτεϊνών, στοιχείο ιδιαίτερης σημασίας για εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Τέλος, στην περίπτωση της εκχύλισης με υγρό υπό πίεση, η εφαρμογή θερμοκρασίας 150 °C δεν φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά τη

διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αντίθετα, η ενζυμική προκατεργασία πριν την εκχύλιση οδήγησε σε περαιτέρω βελτίωση της διαλυτότητας του τελικού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

7.1 Σημαντικές Παρατηρήσεις - Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των παραπροϊόντων βιομηχανίας βαμβακιού για την απομόνωση πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας. Αποτελέσματα πολλών ερευνών υποδεικνύουν ότι τα εν λόγω παραπροϊόντα αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών και επομένως η απόρριψή τους έπειτα από την ανάκτηση του ελαίου των σπόρων στην βιομηχανία συνεπάγεται σημαντική απώλεια εναλλακτικών πηγών φυτικών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, τα οφέλη αυτών των πρωτεϊνών για την υγεία του ανθρώπου καθιστούν την ανάκτηση τους ενδιαφέρουσα και οικονομικά συμφέρουσα για τη βιομηχανία.

Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης της βαμβακόπιτας για την ανάκτηση των πρωτεϊνών που περιέχει και έγινε προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών απόδοσης της διεργασίας. Επίσης στις βέλτιστες συνθήκες πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύνθεσης των αμινοξέων του λαμβανόμενου στερεού και μελέτη του χρώματος και της διαλυτότητας στο εύρος pH από 4 έως 11. Η συμβατική εκχύλιση διενεργήθηκε για αναλογίες στερεού/υγρού 0,03-0,1 w/v και χρόνο εκχύλισης 30-120 λεπτά και φάνηκε ότι ευνοείται σε μεσαίες αναλογίες και μεγάλους χρόνους εκχύλισης και έδωσε ως αποτέλεσμα PY 11%, PR_P 41,1% και PR_E 49,1%, σε αναλογία στερεού/υγρού 0,04 w/v, pH 11 και χρόνο 120 λεπτά. Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση πραγματοποιήθηκε για αναλογίες στερεού/υγρού 0,03-0,1 w/v, χρόνο εκχύλισης 3-10 λεπτά και θερμοκρασία 50-150 °C και ενισχύεται σε μικρές αναλογίες, υψηλές θερμοκρασίες και μεσαίους χρόνους εκχύλισης και έλαβε τιμές PY 18,7%, PR_P 74,8% και PR_E 85,5%, με βέλτιστες συνθήκες αναλογίας στερεού/υγρού 0,03 w/v, pH 11, θερμοκρασίας 150°C και χρόνου εκχύλισης 6 λεπτών. Ακόμη, η ενζυμική προκατεργασία φαίνεται να ενίσχυσε την διεργασία της εκχύλισης, καθώς ανέδειξε μεγαλύτερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο και PR_E από την εκχύλιση χωρίς ένζυμο. Επίσης παρουσίασε μεγαλύτερο PY, αλλά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τελικού στερεού είναι μικρότερο όπως και το PR_P. Τέλος, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους, που έλαβε χώρα για αναλογίες στερεοού/υγρού 0,03-0,1 w/v και ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων 0-500 W και 0-700 W αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ότι προάγεται σε μεσαίες αναλογίες και μεσαία ισχύ μικροκυμάτων και υπερήχων. Συγκεκριμένα παρουσίασε τις τιμές PY 15,7%, PR_P 38,0% και PR_E 46,4%, στις βέλτιστες συνθήκες αναλογίας στερεού/υγρού 0,04 w/v, pH 11, χρόνου εκχύλισης 10 λεπτών και ισχύος μικροκυμάτων και υπερήχων 200 και 450 W, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της κάθε μεθόδου συμπεραίνεται ότι η εκχύλιση υγρού υπό πίεση παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα από κάθε άλλη μέθοδο λαμβάνοντας υπόψιν και τις τρεις μεταβλητές, PY, PR_P και PR_E, αποτελώντας έτσι βέλτιστη επιλογή για την εκχύλιση πρωτεΐνης από την βαμβακόπιτα. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και υπερήχους είναι ικανή να δώσει μεγαλύτερη απόδοση και έτσι ποσότητα τελικού στερεού από την συμβατική. Ωστόσο παρουσιάζει

χαμηλότερα ποσοστά ανάκτησης της πρωτεΐνης της πρώτης ύλης, γεγονός που είναι σημαντικό καθώς ενδιαφέρον δεν παρουσιάζει μόνο η ποσότητα της τελικής λαμβανόμενης μάζας αλλά και το πρωτεϊνικό της περιεχόμενο.

Το προφίλ αμινοξέων που προέκυψε επιβεβαιώνει τη συνέπεια της θρεπτικής αξίας των απομονωμένων πρωτεϊνών της βαμβακόπιτας με αυτή που έχει βρεθεί σε προηγούμενες έρευνες, καθώς ανιχνεύθηκαν 8 απαραίτητα αμινοξέα σε ποσοστό 41,7%, μεγαλύτερο του 29% που προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (2007). Τα αμινοξέα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκαν είναι το ασπαρτικό οξύ (11,52%), το γλουταμικό οξύ (18,65%) και η αργινίνη (8,81%), ενώ με την μικρότερη η μεθειονίνη (1,34%) και η ιστιδίνη (2,10%).

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό του χρώματος, οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν σε pH 8 παρουσίασαν υψηλότερες τιμές φωτεινότητας σε σύγκριση με εκείνες που απομονώθηκαν σε pH 11. Μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης, οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν με τη μέθοδο MUAE εμφάνισαν τη μεγαλύτερη φωτεινότητα συγκριτικά με τις μεθόδους CE και PLE. Οι καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης, επίσης, φαίνεται να αυξάνουν την διαλυτότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών, με την εκχύλιση υγρού υπό πίεση και ενζυμική προκατεργασία να δίνει τα μεγαλύτερα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες που εκχυλίστηκαν μέσω της εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους διαπιστώθηκε ότι παρουσίασαν μεγαλύτερη διαλυτότητα από την συμβατική, ενώ αυτές μέσω της εκχύλισης με υγρό υπό πίεση παρουσίασαν μεγαλύτερη διαλυτότητα από εκείνες με μικροκύματα και υπερήχους στις τιμές pH 4-10. Τελικά, η εκχύλιση υγρού υπό πίεση, κατά την οποία προηγήθηκε και κατεργασία με ένζυμο, φάνηκε ότι είχε την μεγαλύτερη θετική επίδραση στην διαλυτότητα.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώνουν μόνο την αποδοτικότητα των συγκεκριμένων μεθόδων, αλλά αναδεικνύουν και τη δυναμική τους ως πολλά υποσχόμενες τεχνολογικές προσεγγίσεις. Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση διαπιστώθηκε ότι αποτελεί την καλύτερη καινοτόμο μέθοδο εκχύλισης πρωτεϊνών από την βαμβακόπιτα. Παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές σε PY, PR_E και PR_P στον μικρότερο χρόνο και αποτελεί την κατάλληλη μέθοδο για βιομηχανική εφαρμογή, παρόλο που απαιτεί τις μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη και παροχή θερμότητας και πίεσης. Η υψηλή διατροφική αξία των απομονωμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται από την ανάλυση της σύνθεσης των αμινοξέων, καθώς επίσης η διαλυτότητα των πρωτεϊνών φάνηκε να ενισχύεται μέσω αυτής της μεθόδου εκχύλισης. Η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους υπερτερεί, επίσης, από την συμβατική όσον αφορά τον χρόνο εκχύλισης και την διαλυτότητα των λαμβανόμενων πρωτεϊνών. Έτσι μπορεί να επιτευχθεί η αναβάθμιση της υπάρχουσας αξίας της βαμβακόπιτας, η χρήση δηλαδή ως ζωοτροφή, μέσω τις αξιοποίησης των απομονωμένων πρωτεϊνών της στην βιομηχανία τροφίμων. Επιπρόσθετα παρέχεται μία προοπτική αντιμετώπισης της επισιτιστικής κρίσης των ημερών μας, με την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας. Παράλληλα, η εκμετάλλευση παραπροϊόντων μέσω καινοτόμων μεθόδων εξ' ορισμού συμβάλλει στο οικολογικό αποτύπωμα και στην κυκλική οικονομία, καθώς χρησιμοποιούνται πρώτες ύλες που εναλλακτικά θα απορρίπτονταν.

7.2 Προοπτικές για το μέλλον

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση για την αξιοποίηση βιομηχανικών παραπροϊόντων ελαιούχων σπόρων, βαμβακόπιτας συγκεκριμένα, με σκοπό την παραλαβή πρωτεϊνών με υψηλή διατροφική αξία για τον άνθρωπο. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για βαθύτερη έρευνα πάνω στον τομέα αξιοποίησης των συγκεκριμένων παραπροϊόντων για την παραγωγή χρήσιμων και θρεπτικών τροφίμων στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα μερικές μελλοντικές προτάσεις για περαιτέρω έρευνα είναι:

- Μελέτη της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις και κυρίως σε γκοσσυπόλη, με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασής τους στη διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού πρωτεϊνών από τον σπόρο βαμβακιού.

- Η εκχύλιση με χρήση άλατος θα μπορούσε να αυξήσει περαιτέρω την απόδοση και την ανάκτηση πρωτεΐνης.

- Είναι σκόπιμη η μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών που εκχυλίζονται με υγρό υπό πίεση σε θερμοκρασία 150°C, καθώς σε αυτή την θερμοκρασία είναι πιθανή η υποβάθμιση της ποιότητας της πρωτεΐνης.

- Ο χαρακτηρισμός των τελικών καταβυθιζούμενων στερεών ως προς την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης είναι ωφέλιμο να διενεργηθεί με την μέθοδο Kjeldahl, όπως έγινε και για το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της πρώτης ύλης, διότι μπορεί να υπάρχουν αποκλίσεις από την πραγματική τιμή. Σημειώνεται ότι κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας ο συγκεκριμένος χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με επαναδιαλυτοποίηση του στερεού σε αλκαλικό pH και προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης του διαλύματος με τη μέθοδο Lowry.

- Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες συνιστά αποδοτική μέθοδο για την απομόνωση πρωτεϊνών. Η μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων έπειτα από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη είναι μεγάλης σημασίας, καθώς συχνά οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται.

- Η ενσωμάτωση των βέλτιστων εκχυλισμάτων σε προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, με στόχο την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων. Ακόμη σε αυτήν την προοπτική, σκόπιμο θα ήταν να πραγματοποιηθεί και μία μελέτη επίδρασης της ενσωμάτωσης του εκχυλίσματος σε προϊόντα, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

- Η διενέργεια τεχνοοικονομικής μελέτης για τον σχεδιασμό πιλοτικής μονάδας εκχύλισης, βασισμένη στις μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία, μπορεί να φανεί χρήσιμη για την κλιμάκωση της διεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο.

- Σκόπιμη είναι και η ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης συναρτήσει των ανεξάρτητων παραμέτρων μέσω της χρήσης πειραματικών αποτελεσμάτων και βιβλιογραφικών αναφορών, με σκοπό τον βέλτιστο σχεδιασμό της διεργασίας βάσει των επιθυμητών παραμέτρων απόκρισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abirached, C., Bonifacino, C., Dutto, E., Velazco, L., Jorge, F., & Vieitez, I. (2020). Study of sesame seeds antioxidant and emulsifying properties. *The Journal of Supercritical Fluids, 166*, Article 104994. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104994

Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International, 46*(1), 360–369. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.001

Agarwal, P. K. (2006). Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories*.

Aider, M., & Barbana, C. (2011). Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends in Food Science & Technology, 22*(1), 21–39. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.002

Alford, B. B., Liepa, G. U., & Vanbeber, A. D. (1996). Cottonseed protein: What does the future hold? *Plant Foods for Human Nutrition, 49*(1), 1–11.

Altuner, E. M. (2016). A predictive modelling study for using high hydrostatic pressure, a food processing technology, for protein extraction. *Procedia Food Science*. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.103

Aly, A. A., Zaky, E. A., Elhabeby, B. S., Alessa, H., Hameed, A. M., Aljohani, M., … Alghamdi, A. A. A. (2021). Effect of Thyme addition on some chemical and biological properties of sunflower oil. *Arabian Journal of Chemistry, 14*(11), Article 103411. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103411

Arrutia, F., Binner, E., Williams, P., & Waldron, K. W. (2020). Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology, 100*, 88–102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.044

Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010). Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids, 38*(5), 1533–1539. https://doi.org/10.1007/s00726-009-0377-x

Balandrán-Quintana, R. R., Mendoza-Wilson, A. M., Montfort, G. R. C., & Huerta-Ocampo, J. A. (2019). Plant-based proteins. *Proteins: Sustainable source, processing and applications*. Academic Press.

Bandyopadhyay, K., Chakraborty, C., & Barman, A. K. (2012). Effect of microwave and enzymatic treatment on the recovery of protein from Indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science*. https://doi.org/10.5650/jos.61.525

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Springer-Verlag. (1070 p.)

Bernardi, S., Corso, M., Baraldi, I., Colla, E., & Canan, C. (2018). Obtaining concentrated rice bran protein by alkaline extraction and stirring–Optimization of conditions. *International Food Research Journal*.

Bifari, F., & Nisoli, E. (2017). Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: A pharmacological point of view. *British Journal of Pharmacology, 174*(11), 1366–1377. https://doi.org/10.1111/bph.13624

Bose, U., Broadbent, J. A., Byrne, K., Hasan, S., Howitt, C. A., & Colgrave, M. L. (2019). Optimisation of protein extraction for in-depth profiling of the cereal grain proteome. *Journal of Proteomics*. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.02.009

Capellini, M. C., Giacomini, V., Cuevas, M. S., & Rodrigues, C. E. (2017). Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. *Industrial Crops and Products*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.017

Cater, C. M., Mattil, K. F., Meinke, W. W., Taranto, M. V., Lawhon, J. T., & Alford, B. B. (1977). Cottonseed protein food products. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 54*(2), A90–A93.

Chen, R., Meng, F., Zhang, S., & Liu, Z. (2009). Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenosides from ginseng. *Separation and Purification Technology*. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.12.026

Chen, R., Wang, X. J., Zhang, Y. Y., Xing, Y., Yang, L., & Ni, H. (2019). Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125162

Chiang, J. H., Loveday, S. M., Hardacre, A. K., & Parker, M. E. (2019). Effects of soy protein to wheat gluten ratio on the physicochemical properties of extruded meat analogues. *Food Structure, 19*, Article 100102. https://doi.org/10.1016/j

Chmielewska, A., Kozlowska, M., Rachwal, D., Wnukowski, P., Amarowicz, R., Nebesny, E., & Rosicka-Kaczmarek, J. (2021). Canola/rapeseed protein - nutritional value, functionality and food application: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr, 61*(22), 3836–3856. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809342

Chavan, T., Maduke, M., & Swartz, K. (2017). Protein ligands for studying ion channel proteins. *J Gen Physiol*.

Ciabotti, S., Silva, A. C. B. B., Juhasz, A. C. P., Mendonça, C. D., Tavano, O. L., Mandarino, J. M. G., & Gonçalves, C. A. A. (2016). Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colors. *International Food Research Journal, 23*(2), 621–629.

Civitelli, R., Villareal, D. T., Agnusdei, D., Nardi, P., Avioli, L. V., & Gennari, C. (1992). Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. *Nutrition, 8*(6), 400–405. https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0026949821&partnerID=40&md5=321499e72809be47d602d5cdb71810b2

Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040

Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology, 17*, 181–192. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9

Dabbour, M., Hamoda, A., Mintah, B. K., Wahia, H., Betchem, G., Yolandani, Xu, H., He, R., & Ma, H. (2023). Ultrasonic-aided extraction and degossypolization of cottonseed meal protein: Optimization and characterization of functional traits and molecular structure. *Industrial Crops & Products*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117261

Dabbour, M., He, R., Ma, H., & Musa, A. (2018). Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*. https://doi.org/10.1111/jfpe.12799

Damodaran, S., & Paraf, A. (2010). *Food proteins and their applications* (2nd ed.). CRC Press.

De Buckle, T. S., Zapata, L. E., Silva, G., Cabrera, J. A., De Sandoval, A. M., Ben-Gera, I., & Shomer, I. (1979). Two food applications of cottonseed flours and meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 56*(3Part2), 297–299.

Deleu, L. J., Lambrecht, M. A., & Delcour, J. (2019). The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Current Opinion in Food Science*. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.017

Di Cairano, M., Galgano, F., Tolve, R., Caruso, M. C., & Condelli, N. (2018). Focus on gluten free biscuits: Ingredients and issues. *Trends in Food Science & Technology, 81*, 203–212. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.006

Elango, R. (2020). Methionine nutrition and metabolism: Insights from animal studies to inform human nutrition. *Journal of Nutrition, 150*, 2518S–2523S. https://doi.org/10.1093/jn/nxaa155

Embaby, H. E., Swailam, H. M., & Rayan, A. M. (2018). Preparation and physicochemical properties of protein concentrate and isolate produced from *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. *raddiana*. *Journal of Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2957-1

Firatligil-Durmus, E., & Evranuz, O. (2010). Response Surface Methodology for Protein Extraction Optimization of Red Pepper Seed (*Capsicum frutescens*). *LWT – Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.08.017

Flatie, D., Tesfaye, T., Murugesh Babu, K., Gibril, M., & Kong, F. (2023). Extraction and characterization of protein from cottonseed meal. *Environ Waste Management Recycling*. https://doi.org/10.35841/aaewmr-6.2.140

Gamli, Ö. F., & Atasoy, A. F. (2018). Physico-chemical and sensorial properties of groundnut milk and it's yoghurt. *Journal of Food Measurement and Characterization, 12*, 1997–2004. https://doi.org/10.1007/s11694-018-9814-4

Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling Climate Change through Livestock: A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. FAO.

Giarola, R. C., Nabeshima, E. H., Michelazzo Campopiano, J., Ferrari, R. A., Martins Montenegro, F., & Sadahira, M. S. (2022). Effect of sunflower protein meal and electrostatic complexes of sunflower meal-pectin on the cake crumb structure and color. *J Food Sci Technol, 59*, 1419–1428. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05151-z

Gilani, S., Tomé, D., Moughan, P. J., Burlingame, B., & Rutherford, S. M. (2012). True ileal amino acid digestibility coefficients for application in the calculation of DIAAS in human nutrition (Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation...).

Gilani, S., Xiao, C. W., & Cockell, K. A. (2012). Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *British Journal of Nutrition, 108*(S2), S315–S332. https://doi.org/10.1017/S0007114512002371

Gómez-García, R., Martínez-Ávila, G. C. G., & Aguilar, C. N. (2012). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech*. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0055-7

Goldstein, T., Anthony, S. J., Gbakima, A., Bird, B. H., Bangura, J., Tremeau-Bravard, A., ... Mazet, J. A. K. (2018). The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nature Microbiology, 3*, 1084–1089. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2

Görgüç, A.; Bircan, C.; Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077

Gorguc, A.; Bircan, C.; Yılmaz, F.M. (2019). Sesame Bran as an Unexploited By-Product... *Food Chem.*, 283, 637–645. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077

Guo, F., Xiong, Y. L., Qin, F., Jian, H., Huang, X., & Chen, J. (2015). Surface properties of heat-induced soluble soy protein aggregates of different molecular masses. *J Food Sci, 80*, C279–C287. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12761

Guo, X., Tian, S., & Small, D. M. (2010). Generation of meat-like flavourings from enzymatic hydrolysates of proteins from *Brassica* sp. *Food Chemistry, 119*(1), 167–172. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.089

Hernandez, E. (2016). Cottonseed: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of food grains* (2nd ed.). Academic Press.

Jung, S., Lamsal, B. P., Stepien, V., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2006). Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. https://doi.org/10.1007/s11746-006-1178-y

Jung, S., & Mahfuz, A. A. (2009). Low temperature dry extrusion and high-pressure processing prior to enzyme-assisted aqueous extraction of full fat soybean flakes. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.044

Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi, Y., & Matsuda, T. (2000). Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf000180w

Kaur, R., & Ghoshal, G. (2022). Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties. *Adv Colloid Interface Sci, 306*, Article 102725. https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102725

Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers [Review]. *Trends in Food Science & Technology, 105*, 261–272. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012

Korus, J., Chmielewska, A., Witczak, M., Ziobro, R., & Juszczak, L. (2021). Rapeseed protein as a novel ingredient of gluten-free bread. *European Food Research and Technology, 247*, 2015–2025. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03768-0

Krishnan, H. B. (2005). Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Science, 45*, 454–461. https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0454

Kumar, M. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595

Kumar, M., Potkule, J., Patil, S., Mageshwaran, V., Radha, Satankar, V., Souza, C. D. (2021a). Evaluation of detoxified cottonseed protein isolate for application as food supplement. *Toxin Reviews*, *41*(2), 412–419. https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1889605

Kumar, M., Mageshwaran, V., Saxena, S., D'Souza, C., Patil, S., Mahapatra, A., & Tak, Y. (2019). Value addition of cottonseed meal for feed industries by degossypolization employing papain and solvent. *Research Journal of Biotechnology, 14*, 11.

Kutzli, I., Gibis, M., Baier, S. K., & Weiss, J. (2019). Electrospinning of whey and soy protein mixed with maltodextrin – Influence of protein type and ratio on the production and morphology of fibers. *Food Hydrocolloids, 93*, 206–214. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.028

Kyriakopoulou, K., Keppler, J. K., & van der Goot, A. J. (2021). Functionality of ingredients and additives in plant-based meat analogues. *Foods, 10*(3), 600. https://doi.org/10.3390/foods10030600

Lan, T., Dong, Y., Zheng, M., Jiang, L., Zhang, Y., & Sui, X. (2020). Complexation between soy peptides and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Formation mechanism and morphological characterization. *LWT, 134*, Article 109990. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109990

Lassé, M., Deb-Choudhury, S., Haines, S., Larsen, N., Gerrard, J. A., & Dyer, J. M. (2015). The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. *Journal of Food Composition and Analysis, 38*, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.08.007

Lee, S. Y., Show, P. L., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2017). Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. *Biochemical Engineering Journal*. https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.009

Lindseth, G., Helland, B., & Caspers, J. (2015). The effects of dietary tryptophan on affective disorders. *Archives of Psychiatric Nursing, 29*(2), 102–107. https://doi.org/10.1016/j.apnu.2014.11.008

Liu, J.-J., Gasmalla, M. A. A., Li, P., & Yang, R. (2016). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.002

Loveday, S. M. (2019). Food proteins: Technological, nutritional and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual Review of Food Science and Technology, 10*, 311–339. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128

Lusas, E. W., Lawhon, J. T., Clark, S. P., Matlock, S. W., Meinke, W. W., Mulsow, D. W., Rhee, K. C., & Wan, P. J. (1978). Potential for edible protein products from glandless cottonseed. In *Glandless cottonseed: Its significance, status and prospects* (Proceedings). USDA-ARS.

Monogioudi, E., Faccio, G., Lille, M., Poutanen, K., Buchert, J., & Mattinen, M. L. (2011). Effect of enzymatic cross-linking of β-casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloids, 25*(1), 71–81. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.007

Morya, S., Menaa, F., Jimenez-Lopez, C., Lourenco-Lopes, C., BinMowyna, M. N., & Alqahtani, A. (2022). Nutraceutical and pharmaceutical behavior of bioactive compounds of miracle oilseeds: An overview. *Foods, 11*(13), 1824. https://doi.org/10.3390/foods11131824

Mridula, D., Gupta, R. K., Bhadwal, S., Khaira, H., & Tyagi, S. K. (2016). Optimization of food materials for development of nutritious pasta utilizing groundnut meal and beetroot. *J Food Sci Technol, 53*, 1834–1844. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2067-x

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta, 703*(1), 8–18.

Newbold, T., Hudson, L. N., Hill, S. L. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R. A., … Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature, 520*, 45–50. https://doi.org/10.1038/nature14324

Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S. O., & Chuck-Hernández, C. (2017). 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*. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1838-3

Pico, J., Reguilon, M. P., Bernal, J., & Gomez, M. (2019). Effect of rice, pea, egg white and whey proteins on crust quality of rice flour-corn starch based gluten-free breads. *Journal of Cereal Science, 86*, 92–101. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.014

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003

Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014

Qiaoyun, C., Xinghong, N., Liang, Z., Zheng, T., Jin, L., & Kang, S. (2017). Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. *Horticultural Plant Journal*. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.06.003

Rani, R., & Badwaik, L. S. (2021). Functional properties of oilseed cakes and defatted meals of mustard, soybean and flaxseed. *Waste Biomass Valor, 12*, 5639–5647. https://doi.org/10.1007/s12649-021-01407-z

Rathore, K. S., Pandeya, D., Campbell, L. M., & Palle, S. R. (2019). Cotton transgenic event TAM66274. *US patent Application* 2019/0008113 A1.

Rehrah, D., Ahmedna, M., Goktepe, I., & Yu, J. (2009). Extrusion parameters and consumer acceptability of a peanut-based meat analogue. *International Journal of Food Science & Technology, 44*, 2075–2084. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02035.x

Ritchie, H., & Roser, M. (2020). CO_2 and greenhouse gas emissions. *Our World in Data*. https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions

Rommi, K., Hakala, T. K., Holopainen, U., Nordlund, E., Poutanen, K., & Lantto, R. (2014). 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*. https://doi.org/10.1021/jf501802e

Rommi, K., Ercili-Cura, D., Hakala, T. K., Nordlund, E., Poutanen, K., & Lantto, R. (2015). 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*. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01077

Rutherfurd, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *Journal of Nutrition, 145*(2), 372–379. https://doi.org/10.3945/jn.114.195438

Saatchi, A., Kiani, H., & Labbafi, M. (2019). A new functional protein-polysaccharide conjugate based on protein concentrate from sesame processing by-products: Functional and physico-chemical properties. *Int J Biol Macromol, 122*, 659–666. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.122

Salah, K., Olkhovatov, E. A., & Aider, M. (2019). Effect of canola proteins on rice flour bread and mathematical modelling of the baking process. *J Food Sci Technol, 56*, 3744–3753. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03842-2

Salazar-Villanea, S., Hendriks, W. H., Bruininx, E. M. A. M., Gruppen, H., & Van Der Poel, A. F. B. (2016). Protein structural changes during processing of vegetable feed ingredients used in swine diets: Implications for nutritional value. *Nutrition Research Reviews, 29*(1), 126–141. https://doi.org/10.1017/S0954422416000056

Salgado, P. R., Drago, S. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., Andrich, O., & González, R. J. (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT–Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.021

Sari, Y. W., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. M. (2013). Enzyme Assisted Protein Extraction from Rapeseed, Soybean, and Microalgae Meals. *Ind. Crops Prod., 43*, 78–83. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.014

Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*. https://doi.org/10.1002/biot.201400569

Scholz-Ahrens, K. E., Ahrens, F., & Barth, C. A. (2020). Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *Eur J Nutr, 59*, 19–34. https://doi.org/10.1007/s00394-

Schreiber, G. (2002). Kinetic studies of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*.

Schwartz, J.-M., Solé, V., Guéguen, J., Ropers, M.-H., Riaublanc, A., & Anton, M. (2015). Partial replacement of β-casein by napin, a rapeseed protein, as ingredient for processed foods: Thermoreversible aggregation. *LWT - Food Science and Technology, 63*(1), 562–568. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.084

Semba, R. D., Ramsing, R., Rahman, N., Kraemer, K., & Bloem, M. W. (2021). Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security, 28*, Article 100520. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2021.100520

Stern, J. L., Hagerman, A. E., Steinberg, P. D., & Mason, P. K. (1996). Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology, 22*(10), 1877–1899. https://doi.org/10.1007/BF02028510

Statista. (2020). Worldwide production of cottonseed. https://www.statista.com/statistics/259489/worldwide-production-of-cottonseed/ (Accessed July 2020)

Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2020). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International, 76*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017

Sun, X., & Zemel, M. B. (2009). Leucine modulation of mitochondrial mass and oxygen consumption in skeletal muscle cells and adipocytes. *Nutrition and Metabolism, 6*.

Tang, S., Hettiarachchy, N. S., & Shellhammer, T. H. (2002). Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf025771w

Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., & Agboola, S. O. (2011). Canola proteins for human consumption: Extraction, profile, and functional properties. *J Food Sci, 76*, R16–R28. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01930.x

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004

Watchararuji, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.021

Wedegaertner, T., & Rathore, K. (2015). Elimination of gossypol in cottonseed will improve its utilization. *Procedia Environmental Sciences, 29*, 124–125.

Xu, W., Nikolov, A., Wasan, D. T., Gonsalves, A., & Borwankar, R. P. (2003). Foam film rheology and thickness stability of foam-based food products. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 214*, 13–21. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00364-3

Zhan, F., Shi, M., Wang, Y, Li, B., & Chen, Y. (2019). Effect of freeze-drying on interaction and functional properties of pea protein isolate/soy soluble polysaccharides complexes. *Journal of Molecular Liquids*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.126

Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X., & Zhou, X. (2009). Alkaline Extraction Method of Cottonseed Protein Isolate. *Modern Applied Science, 3*(3), 77–82. http://dx.doi.org/10.5539/mas.v3n3p77

Zhang, C., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.020

Zhang, C., Sanders, J. P., Xiao, T. T., & Bruins, M. E. (2015). How does alkali aid protein extraction in green tea leaf residue: A basis for integrated biorefinery of leaves. *PLOS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133046

Καλτσά, Ο. Η Χρήση των Υπερήχων στην Τεχνολογία Τροφίμων. Available from: https://www.foodbites.eu/ultrasonics/

Μισυρλή, Θ.-Β. (2015). Αξιοποίηση παραπροϊόντων ελαιοτριβείου για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης: Διερεύνηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης, in Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙ: Ανάλυση, Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Διεργασιών και Συστημάτων. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.

Ταούκης, Π., & Τζιά, Κ. (2019). *Χημεία, Μικροβιολογία και Αρχές Συντήρησης Τροφίμων*. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Σχολή Χημικών Μηχανικών. ΕΜΠ