



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης & Σχεδιασμού Διεργασιών
Επεξεργασίας Τροφίμων

Πτυχιακή Εργασία

Διεργασίες απομονώσεως πρωτεϊνών από εναλλακτικές
πηγές και εφαρμογές σε προϊόντα τροφίμων

Thesis

Isolation processes of proteins from alternative sources and
their utilization in food products

Σγαρδανά Μαρία Ευφραιμούλα 15097

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Λάζου Ανδριάνα

ΑΙΓΑΛΕΩ 2022

Λάζου Ανδριάννα

Γιαννακούρου Μαρία

Παπαδάκης Σπυρίδων

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Σγαρδανά Μαρία Ευφραιμούλα του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 15097 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπευθύνως ότι:

« Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών και λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου.»

Η δηλούσα

(υπογραφή)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία με θέμα «Διεργασίες απομονώσεως πρωτεϊνών από εναλλακτικές πηγές και εφαρμογές σε προϊόντα τροφίμων» εκπονήθηκε στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Ως την ελάχιστη δυνατή μεία, οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Λάζου Ανδριάννα για την πολύτιμη στήριξη της κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και τη καθοδήγηση που μου πρόσφερε για την εργασία μου. Η σημαντική της βοήθεια, οι ουσιώδεις συμβουλές της και το καλό κλίμα της συνεργασίας μας διαμόρφωσαν την απόφοιτο που είμαι σήμερα.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που με στήριξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου με ανιδιοτελές ενδιαφέρον και υπομονή, ωθώντας με να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η επισκόπηση των μεθόδων απομονώσεως εναλλακτικών πρωτεϊνών και η εφαρμογή τους στα τρόφιμα. Ως εναλλακτικές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται οι φυτικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα έντομα και οι πρωτεΐνες των μικροοργανισμών - βακτήρια, μύκητες και μικροφύκη. Σημαντική είναι η εύρεση της κατάλληλης διεργασίας απομονώσεως των πρωτεϊνών στόχων από την εκάστοτε πηγή. Οι διεργασίες απομόνωσης -εκχύλισης πρωτεϊνών διαχωρίζονται σε συμβατικές ξηρές και υγρές, οι οποίες χωρίζονται στη χημική εκχύλιση, την εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό, την αντίστροφη εκχύλιση μικκυλίων και το υδατικό διφασικό σύστημα. Επίσης, μια μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών μη συμβατική είναι η εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων. Επίσης, υπάρχουν και οι φυσικές μέθοδοι οι οποίες χωρίζονται στις μεθόδους εκχύλισης πρωτεϊνών με τη βοήθεια μικροκυμάτων, υπερήχων, σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, με υψηλή πίεση και με υπερκρίσιμο ρευστό. Οι εφαρμογές των εναλλακτικών πηγών σε προϊόντα τροφίμων είναι εκτεταμένες και όσο περνάει ο καιρός η αποδοχή τους από τους καταναλωτές αυξάνεται. Κάθε εναλλακτική πηγή παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων με τη κατηγορία των φυτικών πηγών πρωτεΐνης να είναι η πιο αποδεκτή. Η κατάλληλη διεργασία απομόνωσης και η εφαρμογή της εναλλακτικής πρωτεΐνης για την παραγωγή προϊόντων τροφίμων προκύπτει από το συνδυασμό όλων των παραπάνω.

ABSTRACT

The topic of this thesis is the review of alternative protein isolation methods and their application to food. Alternative proteins are defined as plant proteins, proteins contained in insects and proteins of microorganisms - bacteria, fungi and microalgae. It is important to find the appropriate process to isolate the target proteins from the source. Protein isolation-extraction processes are divided into conventional dry and wet processes, which are divided into chemical extraction, subcritical water extraction, reverse micelle extraction and aqueous biphasic system. In addition, an unconventional method of protein extraction is enzyme-assisted extraction. There are also physical methods which are divided into microwave, ultrasonic, pulsed electric field, high pressure and supercritical fluid extraction methods. The applications of alternative sources in food products are extensive and their acceptance by consumers is increasing over time. Each alternative source presents a plethora of advantages with the category of plant protein sources being the most accepted. The appropriate isolation process and application of the alternative protein for the production of food products results from the combination of all the above.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	9
1.Εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών	12
1.1Φυτικές πηγές (Plant sources)	12
1.2 Έντομα (Insects).....	18
1.3 Μικροοργανισμοί (Microorganisms).....	24
1.3.1 Βακτήρια (Bacteria).....	25
1.3.2 Μύκητες (Fungus).....	25
1.3.3 Μικροφύκη (Microalgae)	27
2. Διεργασίες απομόνωσης.....	30
2.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ξηρών πρωτεϊνών (Conventional dry proteins extraction methods)	30
2.2 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης υγρών πρωτεϊνών (Conventional wet proteins extraction methods)	31
2.2.1 Χημική εκχύλιση (Chemical extraction)	32
2.2.2 Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (Subcritical water extraction).....	35
2.2.3 Αντίστροφη εκχύλιση μικκυλίων (Reverse micelles extraction (RM))	36
2.2.4 Εκχύλιση με υδατικά διφασικά συστήματα (Aqueous two-phase systems extraction (ATPSs)).....	38
2.3 Μη συμβατική μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα (Non-conventional proteins extraction method) (Enzyme-assisted extraction of proteins (EAE))..	40
2.4 Φυσικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Physical methods for extraction of proteins)..	46
2.4.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-assisted extraction(MAE))	47
2.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-assisted extraction (UAE))	50
2.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed electric field (PEF)-assisted extraction)	58
2.4.4 Εκχύλιση με υψηλή πίεση (High pressure extraction (HPE))	62
2.4.5 Εκχύλιση πρωτεϊνών με υπεγκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid extraction (SFE)) .	66
3. Εφαρμογές στα προϊόντα τροφίμων.....	69
3.1 Εφαρμογές των φυτικών πρωτεϊνών	69
3.2 Εφαρμογές των πρωτεϊνών που παράγονται από έντομα	71

3.3 Εφαρμογές των πρωτεϊνών που παράγονται από μικροοργανισμούς	73
3.4 Αποδοχή των εναλλακτικών πρωτεϊνών από τους καταναλωτές.....	76
3.4.1 Παράγοντες αποδοχής που αφορούν το προϊόν	77
3.4.2 Ψυχολογικοί παράγοντες.....	80
3.4.3 Παράγοντες κοινωνικοί και πολιτισμικοί.....	80
4. Συμπεράσματα	81
5. Βιβλιογραφικές Αναφορές	84

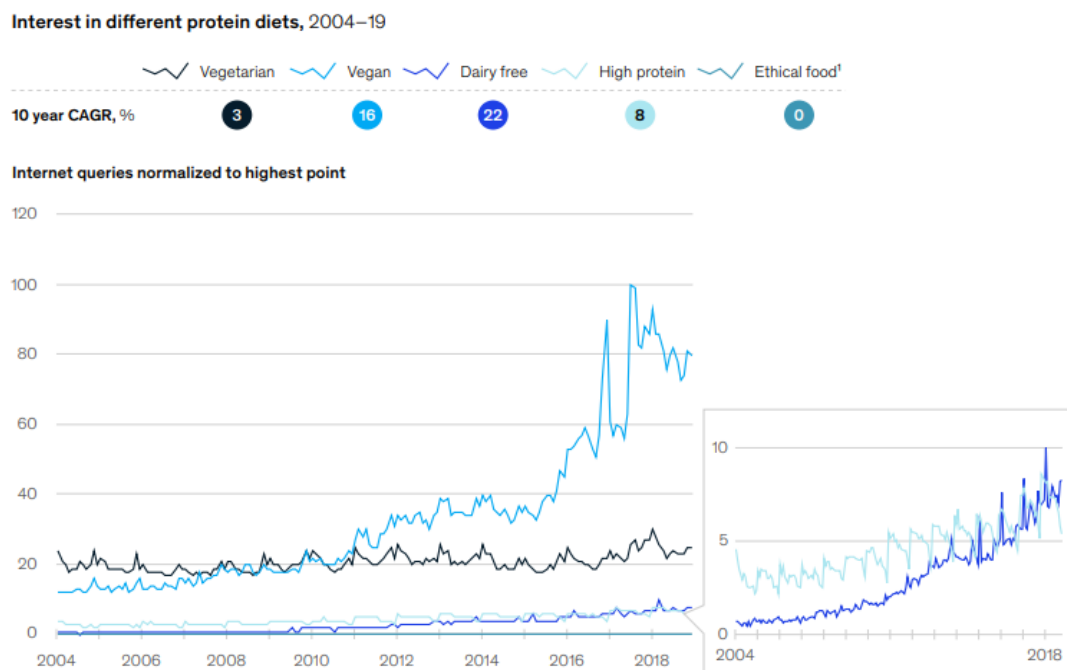
Εισαγωγή

Τα τρόφιμα είναι το πρωτεύων δομικό υλικό για την ανθρώπινη ζωή παγκοσμίως. Πέρα από γεωγραφικά όρια, θρησκευτικές πεποιθήσεις, φύλο και ηλικία αποτελούν τη βασική έννοια του εκάστοτε καταναλωτή σε οποιαδήποτε εποχή. Μέγιστη σημασία δίνεται στις πρωτεΐνες που διαθέτουν λόγω της συνεχούς αύξησης του πληθυσμού η οποία εκτιμάται να φτάσει τα 10 δισεκατομμύρια άτομα το 2050 (Forum, 2019). Συγκεκριμένα η παραγωγή κρέατος προβλέπεται πως θα ξεπεράσει τα επίπεδα απαιτήσεων που υπήρχαν το 2006 (Gómez et al., 2019) με συνέπεια αναπόφευκτη την αυξανόμενη ζήτηση των πρωτεϊνών και τον επικείμενο φόβο για έλλειψη αυτών (Maurya & Kushwaha, 2019).

Τα αμινοξέα είναι μια βασική κατηγορία χημικών ουσιών που βρίσκονται στα τρόφιμα και περιλαμβάνουν στο μόριο τους τουλάχιστον μια αμινομάδα ($-NH_2$) και τουλάχιστον μια καρβοξυλομάδα ($-COOH$). Αυτά ενώνονται μεταξύ τους και μέσω των πεπτιδικών δεσμών δημιουργούν τα πεπτίδια και στη συνέχεια τις πρωτεΐνες (Σφλώμος Κ. 2018).

Τη κυρίαρχη πηγή πρωτεϊνών αντιπροσωπεύουν τα ζωικής προέλευσης προϊόντα (το κρέας και τα γαλακτοκομικά). Σχεδόν καθολικά έχουν αναλάβει τη κάλυψη των αναγκών όσον αφορά τις πρωτεΐνες. Η βιομηχανία των προϊόντων ζωικής προέλευσης έχει μεγάλο αντίκτυπο κοινωνικά. Η παραγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης εμφανίζει περιβαλλοντικό αντίκτυπο και τα αποτελέσματα δεν είναι οφέλιμα με χαρακτηριστικά παράδειγματα την επιρροή που ασκεί στη κατανάλωση του νερού που απαιτείται για τη παραγωγή κρέατος και τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (Hertzler et al., 2020). Πέρα από την ανησυχία για την επιβάρυνση της φύσης υπάρχει προβληματισμός και για την ευημερία των ζώων. Ευρέως γνωστές κοινότητες οι οποίες απέχουν από το κρέας, τα ψάρια, τα γαλακτοκομικά, τα αυγά όπως χορτοφάγοι (vegetarian), επιλεκτικοί χορτοφάγοι (flexitarian) ή αυστηρά χορτοφάγοι (vegan) έχουν κινητοποιηθεί και απαιτούν την αλλαγή του μέχρι τώρα διαιτολογίου. Σύμφωνα με το Food Marketing Institute το 2020 μελετήθηκε πως το 27% των καταναλωτών ανησυχούν για το περιβαλλοντικό αποτύπωμα και συγχρόνως το 24% αυτών για την ευημερία των ζώων. Δεοντολογικά ζητήματα κάθε πολιτισμού είναι ένας επιπλέον παράγοντας που

συμβάλλει στην αύξηση του ενδιαφέροντος των καταναλωτών για αλλαγή στη διατροφή τους. [Διάγραμμα 1] (Bashi et al., 2019).



Διάγραμμα 1 : Το εξελισσόμενο ενδιαφέρον των καταναλωτών στη παρουσία των εναλλακτικών πρωτεϊνών στη διατροφή στο πέρασμα των τελευταίων 15 ετών (Bashi et al., 2019).

Επιπρόσθετα, μείζον θέμα αποτελεί και η υγεία των καταναλωτών. Μέσα από την εμπειρία των 2 τελευταίων χρόνων, ειδικά με τη πανδημία του Covid-19, η αγορά κινείται προς την επιλογή του θρεπτικού και υγιεινού (Food Marketing Institute, FMI 2021). Η αλλαγή προς το ευ ζην, το αποτέλεσμα που έχει το τελικό προϊόν στους φυσικούς πόρους (βιωσιμότητα) και η αναζήτηση του καινοτόμου, με πρωταρχικό σκοπό τη κάλυψη των αναγκών της αγοράς, έφεραν στο προσκήνιο τις εναλλακτικές πρωτεΐνες (Bashi et al., 2019).

Οι εναλλακτικές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται έτσι λόγω της απουσίας ζωικής ύλης από κρέας ή γαλακτοκομικά προϊόντα (Bashi et al., 2019). Αποτελούν καινοτόμο θρεπτικό υποκατάστατο της βασικής πηγής των πρωτεϊνών και είναι πλούσιες σε αμινοξέα. Πολλές κατηγορίες αυτών είναι ήδη αποδεκτές από το ευρύ κοινό ενώ άλλες αποτελούν αντικείμενο έρευνας.

Οι πιο γνωστές κατηγορίες είναι:

- Οι φυτικής προέλευσης πρωτεΐνες ή αλλιώς φυτικές πρωτεΐνες (plant based proteins). Περιλαμβάνουν τα όσπρια, τους σπόρους ή καρπούς,

με τη σόγια και τον αρακά να αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα, καθώς και το αμύγδαλο (almond), η chia, η πατάτα (potato), η βρώμη (oat), η κινόα (quinoa), το φουντούκι (hazelnut) (Bashi et al., 2019).

- Οι πρωτεΐνες των εντόμων (insects), με χαρακτηριστικό παράδειγμα το τριζόνι (cricket). Μια κατηγορία που αναζητά την αποδοχή από το σύνολο για την εισαγωγή της στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων με βασικό επιχείρημα τα οικονομικά οφέλη που προσφέρει (Forum, 2019).
- Οι πρωτεΐνες μικροοργανισμών. Οι πρωτεΐνες προερχόμενες από μικροφύκη (microalgae), δηλαδή υδρόβιους οργανισμούς (Onwezen et al., 2021) Μόνο λίγες εταιρείες έχουν ξεκινήσει δοκιμαστικές εφαρμογές αυτών στα τρόφιμα (Cultivating Plant-Based Proteins (foodprocessing.com)). Οι πρωτεΐνες από μύκητες (fungus) (Μυκοπρωτεΐνες) οι οποίες προέρχονται από μη επεξεργασμένη νηματοειδείς μυκητιακή βιομάζα, γνωστή ως μούχλα και οι πρωτεΐνες από βακτήρια (bacteria). Οι μυκοπρωτεΐνες τυπικά αναμειγνύονται με αυγό για την επίτευξη υψής παρόμοιας με το κρέας. Έχουν ουδέτερο άρωμα και η γεύση τους προσδίδει ευελιξία στη χρήση (Bashi et al., 2019).

Η Tamara Charm επικεφαλής στο τμήμα Agile Consumer Insight στη McKinsey & Co σε συνέντευξή της αναφέρει πως η τάση των εναλλακτικών πρωτεϊνών θα μεταποιήσει τη γνωστή ως τώρα ετικέτα των τροφίμων μέχρι τη διαφήμιση αυτών στο χώρο του μάρκετινγκ. Στο πίσω μέρος της συσκευασίας θα αναγράφεται η βιοδιαθεσιμότητα (αναλογία ενός θρεπτικού συστατικού που τελικά απορροφάται από ένα τρόφιμο, επί της συγκέντρωσης που αρχικά περιέχεται στο τρόφιμο) και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Ο Justin Whitmore συμπληρώνει βέβαια πως σε 20 με 30 χρόνια το κρέας δεν θα πάψει να υφίστανται στα πιάτα των καταναλωτών αλλά πιστεύει πως οι εναλλακτικές πρωτεΐνες θα αποτελούν μια ακόμη εξαιρετική επιλογή (Whitmore, 2019).

οργανισμό ,όπως συνηθίζεται στα ζωικά προϊόντα. Στη βιομηχανία τροφίμων υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα πολλών φυτικών απομονώσεων και συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών (σόγια, μπιζέλια, κράμβη, πατάτα, φάβα κ.λπ.) τα οποία είναι πλούσια σε αμινοξέα απαραίτητα για τον καταναλωτή (Hertzler et al., 2020).

Η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη πρωτεΐνης καλής ποιότητας για τη διατήρηση της βέλτιστης μυϊκής μάζας, δύναμης και λειτουργίας είναι 0,8 g/kg σωματικού βάρους (ΣΒ)/ ημέρα (Wu et al., 2021). Οι βέλτιστες πηγές πρωτεΐνης για τον άνθρωπο είναι ζωικής προέλευσης (Kärenlampi & White, 2009). Παρόλα αυτά οι φυτικές πρωτεΐνες πολλές φορές δεν υστερούν και ανταποκρίνονται σε μεγάλο βαθμό στις απαιτήσεις του οργανισμού. Ωστόσο πρέπει να γίνεται γνωστό πως οι φυτικές πρωτεΐνες έναντι των ζωικών παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη ποιότητα οπότε απαιτείται προσοχή στους καταναλωτές που τείνουν προς την εναλλακτική αυτή πηγή (Hertzler et al., 2020). Στους πίνακες 1.1 και 1.2 και 1.3 αναφέρεται η περιεκτικότητα πρωτεΐνης κάποιων φυτικών πηγών και η παρουσία αμινοξέων αντίστοιχα.

Πίνακας 1.1 Περιεκτικότητα πρωτεΐνης φυτικών πηγών

ΕΙΔΟΣ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Αμύγδαλο	16-23g/100g 20-30%	(Grundy et al., 2016) (De Oliveira Sousa et al., 2011)
Φλοιός ρυζιού	1,93-7%	(Hoogenkamp et al., 2017)
Σπόροι chia	18-24% 18,8-21,5%	(Killeit, 2019) (Ullah et al., 2016)
Φουντούκι	17-59% (πυρήνας) 15,35±0,42g/100g	(Aydin, 2002) (Alasalvar et al., 2003)
Κανναβόσπορος	20-25%	(Farinon et al., 2020)
Βρώμη	16,9g/100g	(Mushtaq et al., 2014)
Βρώμη χωρίς φλοιό (πλιγούρι)	12-24%	(Mushtaq et al., 2014)
Αρακάς (μπιζέλι)	18-36% 23,1-30,9%	(Tulbek et al., 2016) (Lam et al., 2018)
Πατάτα	20g/kg νωπού βάρους	(Wu et al., 2021)

Σάρκα βρασμένης πατάτας μαγειρεμένη με φλούδα χωρίς αλάτι	2,54g	(Wu et al., 2021)
Κινόα	12-20% 13,8-16,5%	(Fernández-López et al., 2021) (Navruz-Varli & Sanlier, 2016)

Η πρωτεΐνη της βρώμης χαρακτηρίζεται σχεδόν ισοδύναμη σε ποιότητα με τη πρωτεΐνη της σόγιας. Όπως έχει γνωστοποιηθεί από το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η πρωτεΐνη της σόγιας είναι ίση με αυτή από το κρέας, το γάλα και το αυγό άρα εντοπίζεται και η σημαντικότητα της πρωτεΐνης από βρώμη (Mushtaq et al., 2014).

Για τον αρακά βρέθηκε πως οι σπόροι συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη τους. Το ποσοστό πρωτεΐνης ανάλογα με τις περιβαλλοντικές επιδράσεις που το επηρεάζουν και τη ποικιλία σημειώνει τιμές από 18% έως 30% για τον σπόρο. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες από ζωική πηγή, οι πρωτεΐνες από αρακά περιέχουν βασικά αμινοξέα σε βασικές αναλογίες, με τη μεθειονίνη να αποτελεί το περιοριστικό αμινοξύ (Tulbek et al., 2016).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ακόμη πως οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών αρακά βελτιώνονται με τη χρήση ενζυματικών επεξεργασιών. Βελτιώθηκε η αντοχή του γαλακτώματος που παρασκευάστηκε έπειτα από επεξεργασία με τρανσγλουταμινάση και αυξήθηκε η ικανότητα γαλακτωματοποίησης λόγω της παρουσίας όξινων πρωτεασών. Αυτές οι επεξεργασίες συνέβαλλαν στη μετατροπή των απομονωμένων πρωτεϊνών του μπιζελιού σε λειτουργικές οι οποίες μπορούν να συγκριθούν με πρωτεΐνες από ασπράδι αυγού και σόγιας (Tulbek et al., 2016).

Πίνακας 1.2 Ενδεικτικά παραδείγματα απαραίτητων αμινοξέων φυτικών πηγών

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ Αμινοξέα										
ΦΥΤΙΚΗ ΠΗΓΗ	Mth	Thre	His	Val	Phen	Ile	Leu	Lys	Try	ΑΝΑΦΟΡΑ
Ρύζι	+	+	+	+	+	+	+	+		(Hoogenkamp et al., 2017)
Αρακάς	+						+	+	+	(Lam et al., 2018; Sandberg, 2011)
Chia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Muñoz et al., 2013)

Αμύγδαλο	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Gu et al., 2020)
Πατάτα	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Alting et al., 2011)
Βρώμη	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Klose & Arendt, 2012)
Φουντούκι	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Alasalvar et al., 2003)
Κινόα	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Dakhili et al., 2019)

* Mth-μεθειονίνη, Thre-τρεονίνη, His-ιστιδίνη, Val-βαλίνη, Phe-φαινυλαλανίνη, Ile-ισολευκίνη, Leu-λευκίνη, Lys-λυσίνη, Tyr-τρυπτοφάνη.

Πίνακας 1.3 Ενδεικτικά παραδείγματα μη απαραίτητων αμινοξέων φυτικών πηγών

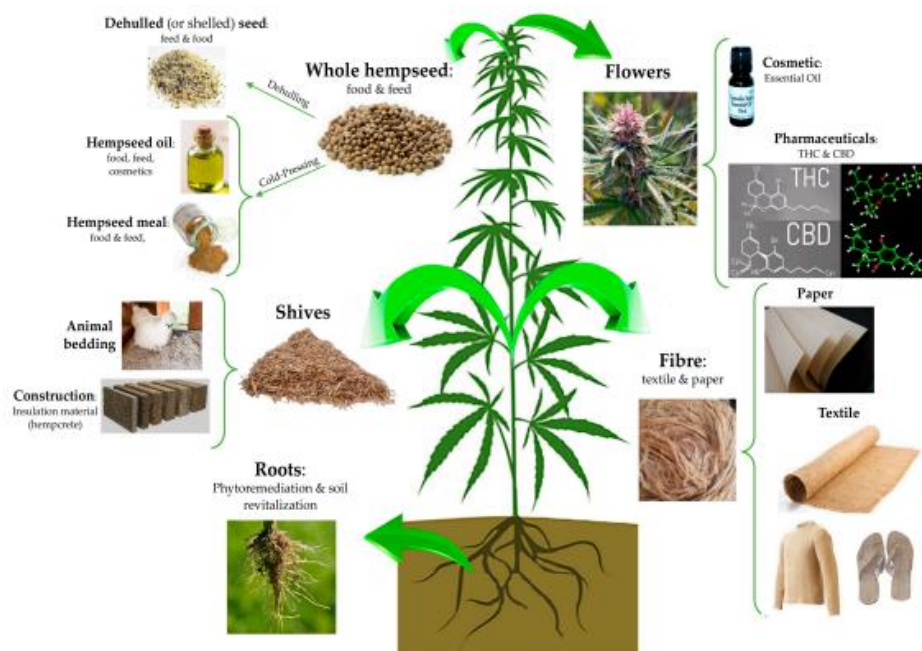
ΜΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ									
ΦΥΤΙΚΗ ΠΗΓΗ	Ala	Ga	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ser	Pro	ΑΝΑΦΟΡΑ
Ρύζι			+	+	+	+			(Hoogenkamp et al., 2017)
Αρακάς		+	+	+					(Lam et al., 2018; Sandberg, 2011)
Chia	+	+	+		+	+	+		(Muñoz et al., 2013)
Αμύγδαλο			+	+		+	+		(Gu et al., 2020)
Πατάτα					+				(Alting et al., 2011)
Βρώμη			+	+	+			+	(Klose & Arendt, 2012)
Φουντούκι	+	+	+	+	+	+	+	+	(Alasalvar et al., 2003)
Κινόα	+		+	+		+	+	+	(Dakhili et al., 2019)

* Ala-αλανίνη, Ga-γλουταμινικό οξύ, Arg-αργινίνη, Cys-κυστίνη, Tyr-τυροσίνη, Gly-γλυκίνη, Ser-σερίνη, Pro-προλίνη.

Έρευνες επίσης έχουν διεξαχθεί για τη σημαντικότητα των φυτικών πρωτεϊνών στην υγεία του καταναλωτή. Τη σχέση των πρωτεϊνών με καρδιολογικές παθήσεις, το διαβήτη, τη παχυσαρκία, ίσως ακόμα και το καρκίνο, αλλά και το χαρακτηρισμό τους ως λειτουργικό τρόφιμο. Από τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη (Hertzler et al., 2020).

Μια άλλη πηγή φυτικής πρωτεΐνης αποτελεί ο σπόρος κάνναβης (*Cannabis sativa L.*). Η κάνναβη είναι ένα ποώδες φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Cannabaceae*. Παρασκευάζεται για βιομηχανικούς, φαρμακευτικούς ή και ψυχαγωγικούς λόγους με αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις πρώτες δύο κατηγορίες (Farinon et al., 2020). Οι σπόροι κάνναβης περιέχουν 20-25% πρωτεΐνες, εύκολες στη πέψη, πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα, εξαρτώμενες από τη ποικιλία και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίες συναντώνται στο εσωτερικό τμήμα των σπόρων. Χαρακτηριστικές είναι η σφαιρίνη (60-80% του συνόλου των πρωτεϊνών) και η αλβουμίνη (20-40% του συνόλου των πρωτεϊνών). Οι σφαιρίνες περιέχουν σε ποσοστό 93%

την 11S εστεδίνη και το υπόλοιπο 7% αποτελεί την 7S σφαιρίνη (βισιλίνη) (Potin et al., 2019).



Εικόνα 1.2: Οι πολλαπλές εφαρμογές του φυτού της κάνναβης

Πηγή: (Farinon et al., 2020)

Η εστεδίνη συναντάται σε 3 μορφές οι οποίες έχουν διαφορετική ακολουθία αμινοξέων και μοριακό βάρος αλλά είναι και οι τρεις πλούσιες σε αργινίνη. Φυσικά αποτελείται από απαραίτητα αμινοξέα που ζητούνται από τον ανθρώπινο οργανισμό με άφθονο να είναι το γλουταμινικό οξύ (3,74-4,58% από το σύνολο του καρπού) ακολουθούμενο από την αργινίνη (2,28-3,10% από το σύνολο του καρπού), ενώ η λυσίνη εκτιμάται ως το λιγότερο υπάρχον με ποσοστό κάτω από 1%. Ιδιαίτερη σημασία έχουν και αμινοξέα που δεν κατατάσσονται στα απαραίτητα όπως η αργινίνη η οποία –αν και όχι μόνο αυτή- συμβάλλει στο χαρακτηρισμό του κανναβόσπορου ως προϊόν βέλτιστης ανοσολογικής λειτουργίας και αποκατάστασης των μυών (Farinon et al., 2020).

Σε έρευνα που έγινε στον Καναδά το 2020 (από τον Αύγουστο έως τον Δεκέμβριο) διερευνήθηκαν οι αντιλήψεις των ασθενών καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος σχετικά με τη χρήση κάνναβης ως μέρος της θεραπείας τους. Στα αποτελέσματα βρέθηκε πως οι συμμετέχοντες πίστεψαν πως η κάνναβη καλυτέρευσε τον ύπνο τους (70,2%), το άγχος που τους διακατείχε (65,9%) και τη διάθεσή τους γενικότερα (72,3%). Βέβαια ως προς

την πεποίθηση ότι η κάνναβη έχει τη δυνατότητα να συμβάλλει στην αντιμετώπιση του καρκίνου οι συμμετέχοντες βρέθηκαν αβέβαιοι (38,3%) ή ουδέτεροι (31,9%) (Taneja et al., 2021).

Θετική επιρροή στην υγεία του καταναλωτή έχει γίνει γνωστό πως έχει και η κινόα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στην ξηρή ύλη των σπόρων κινόα κυμαίνεται μεταξύ 13,8% και 16,5%. Αποτελείται από αλβουμίνες (35%) και σφαιρίνες (37%) και περιέχει χαμηλή περιεκτικότητα σε προλαμίνες. Επειδή περιέχει βασικά αμινοξέα λέγεται πως έχει παρόμοια πρωτεϊνική αξία με τις καζεΐνες του γάλακτος. Μια μελέτη απέδειξε πως η κατανάλωση καραμελών κινόα από 22 φοιτητές ηλικίας 18-45 για διάστημα 30 ημερών μείωσε σημαντικά τα τριγλυκερίδια, τη συνολική χοληστερόλη, τα επίπεδα της LDL, της γλυκόζης του αίματος και της αρτηριακής πίεσης (Navruz-Varli & Sanlier, 2016).

Ο σίτος και το ρύζι αποτελούν φυτική πηγή προέλευσης πρωτεϊνών. Σε ποσοστό 8,3-19,3% στο πύουρο σιταριού και 12-20% στο πύουρο ρυζιού εμφανίζονται οι πρωτεΐνες με κύριες να είναι η αλβουμίνη (23,5% για το αλεύρι και 37% για το ρύζι), γλοβουλίνη (15,5% για το αλεύρι και 36% για το ρύζι), προλαμίνη (18,5%) και γλουτενίνη (25,5%). Είναι άξιο αναφοράς πως οι πρωτεΐνες του πύουρου ρυζιού εκτιμάται πως έχουν υψηλό θρεπτικό φορτίο λόγω του μεγάλου αριθμού απαραίτητων αμινοξέων που τις χαρακτηρίζουν με παράδειγμα την ιστιδίνη, αργινίνη, βαλίνη, μεθειονίνη, τυροσίνη κ.α. (Sozer et al., 2017).

Τα συστατικά των φυτών προτείνεται να απομονώνονται από τη πηγή τους αφού έχει βρεθεί πως τα περιβάλλουν νέες δυνατότητες μεγάλου ενδιαφέροντος. Οι τρόποι εξαγωγής των πρωτεϊνών από φυτικές πηγές και ο επερχόμενος καθαρισμός τους είναι σύνθετες διαδικασίες με στόχο τη χρήση των απομονωμένων πρωτεϊνών από τη παραγωγή στη κατανάλωση. Η βιομηχανία για να ξεπεράσει την έλλειψη σε πρωτεΐνες χρησιμοποιεί τις καινοτόμες μεθόδους απομόνωσης από τα φυτά (Bilek, 2018).

Μέσα από την υφιστάμενη προσοχή που δίνεται σε μια μέθοδο απομόνωσης πρωτεϊνών γίνεται αντιληπτό πως πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τη διαδικασία. Το φυτό, το μέρος του φυτού, η ίδια η μέθοδος και ο διαλύτης ο οποίος ποικίλλει. Οι μέθοδοι παλιές και καινοτόμες έχουν στόχο την λήψη

πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας. Μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών ξηρές ή υγρές, συμβατικές ή μη, με τα προκύπτοντα πρωτεϊνικά προϊόντα να κατηγοριοποιούνται σε άλευρο πρωτεΐνης (έως και 65% παρουσία πρωτεΐνης), συμπυκνώματα πρωτεϊνών (έως και 65-90% παρουσία πρωτεΐνης) και απομονωμένες πρωτεΐνες (με πάνω από 90% παρουσία πρωτεΐνης) εμφανίζονται στη βιομηχανία (Bilek, 2018; Kumar et al., 2021; Rojić et al., 2018).

1.2 Έντομα (Insects)

Ο πληθυσμός αναμένεται στα επόμενα 29 χρόνια να φτάσει τα 9,8 δισεκατομμύρια με αποτέλεσμα να σημειωθεί υψηλή ζήτηση στη παραγωγή τροφίμων για την εξυπηρέτηση των καταναλωτών. Από το 2013 δημοσιεύονται εκθέσεις του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) για τα εδώδιμα έντομα και τις προοπτικές τους στο μέλλον στη παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών. Για τον χαρακτηρισμό της κατανάλωσης εντόμων από τον άνθρωπο έχει εισαχθεί ο όρος εντομοφαγία και πιο πρόσφατα ο όρος ανθρωποεντομοφαγία. Ο πρώτος χρησιμοποιείται και σε περιπτώσεις κατανάλωσης εντόμων από ζώα (Chow et al., 2021; Costa-Neto & Dunkel, 2016).

Πλεονεκτήματα σε επίπεδο διατροφής, περιβαλλοντικό και οικονομικό χαρακτηρίζουν τα έντομα. Οι χαμηλές εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, η μετατροπή αυτών σε ζωοτροφές, η μικρή επιρροή στις εκτάσεις γης και η ικανότητα μετατροπής οργανικών δευτερευόντων ρευμάτων χαμηλής αξίας σε υψηλής αξίας πρωτεϊνικά προϊόντα είναι μερικά από τα παραδείγματα των πλεονεκτημάτων. Ορισμένα είδη εντόμων μπορούν να καλλιεργηθούν βιολογικά μειώνοντας τη περιβαλλοντική μόλυνση και μετατρέποντας τα απόβλητα σε ζωοτροφές ή οργανικό λίπασμα. Οι ζωοτροφές χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά περιεκτικότητας πρωτεϊνών με δυνατότητα αντικατάστασης άλλων ακριβών σύνθετων συστατικών ζωοτροφών όπως το ιχθυάλευρο. Για την υλοποίηση αυτής της πρακτικής απαιτείται μια αποδοτική, αυτοματοποιημένη και οικονομικά αναπτυγμένη εγκατάσταση μαζικής εκτροφής της οποίας αποτέλεσμα θα είναι ένα ασφαλές προϊόν (Gómez et al., 2019; Arnold Van Huis, 2013, 2016).

Σε παγκόσμια κλίμακα οι τάξεις των εντόμων που καταναλώνονται από τον άνθρωπο είναι τα κολεόπτερα (19 οικογένειες και 467 είδη), τα λεπιδόπτερα (29 οικογένειες και 296 είδη), τα υμενόπτερα (6 οικογένειες και 268 είδη), τα ορθόπτερα (9 οικογένειες και 219 είδη) τα ημίπτερα (140 οικογένειες και 80.000 είδη), τα ισόπτερα, τα δίπτερα (περίπου 124 χιλιάδες είδη), οι φυλλοφάγοι Odonata. Τα χαρακτηριστικά έντομα που στο διαιτολόγιο των ανθρώπων είναι τα σκαθάρια (31%) από την τάξη κολεόπτερων, οι κάμπιες (18%) από την τάξη λεπιδόπτερων, οι σφήκες, οι μέλισσες και τα μυρμήγκια (15%) από την τάξη υμενόπτερων, οι γρύλοι και οι ακρίδες (13%) από την τάξη ορθόπτερων, τα τζιτζίκια, οι φυλλορύκτες και τα αληθινά ζώφια από την τάξη ημίπτερων, οι τερμίτες από την τάξη ισόπτερων, οι μύγες από τη τάξη δίπτερων και οι λιβελούλες από τους φυλλοφάγους Odonata (Costa-Neto & Dunkel, 2016; Pal & Roy, 2014).

Είναι ακόμη παγκοσμίως αναγνωρισμένο πως οι πρωτεΐνες που απομονώνονται από έντομα αποτελούν πηγή υψηλής διατροφικής ποιότητας. Επομένως πολλές δημοσιεύσεις επικεντρώνονται στη διατροφική αξία των εντόμων χωρίς να επιτρέπεται γενίκευση της αξίας αυτών ως σύνολο εξαιτίας της ποικιλίας της διατροφικής σύνθεσης των διαφορετικών ειδών που έχουν καταγραφεί. Οι παράγοντες που ασκούν επιρροή προκαλούν τελικά διακύμανση στα θρεπτικά συστατικά κάθε εντόμου που μελετάται. Το είδος, το φύλο, η διατροφή, ο τύπος, το στάδιο ανάπτυξης, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το μήκος της ημέρας, η υγρασία, η ένταση του φωτός και η φασματική σύνθεση αλλά και οι μέθοδοι παρασκευής (βρασμός, τηγάνισμα, ψήσιμο, ξήρανση) πριν την κατανάλωση και οι μέθοδοι επεξεργασίας μπορούν να επηρεάσουν τη θρεπτική αξία της σύνθεσης του εντόμου (Akhtar & Isman, 2018; A. Van Huis & Dunkel, 2017; Arnold Van Huis, 2013).

Τα έντομα περιέχουν πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες και ορισμένα μέταλλα (ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, φώσφορο) και βιταμίνες (βιταμίνη A, B σύμπλεγμα, C). Από αυτά περαιτέρω σημασία δίνεται στις πρωτεΐνες που αποτελούν και το θέμα της πτυχιακής εργασίας. Τα απαραίτητα αμινοξέα που απομονώνονται από τα έντομα είναι η μεθειονίνη, η κυστεΐνη, η λυσίνη, η λευκίνη, η τρυπτοφάνη, η βαλίνη και η θρεονίνη. Η

περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες για ένα έντομο μπορεί να προσδιοριστεί αν πολλαπλασιαστεί η ποσότητα του αζώτου επί 6,25, γνωστή και ως περιεκτικότητα ακατέργαστης πρωτεΐνης. Λόγω της παρουσίας και άλλων ενώσεων με περιεκτικότητα αζώτου, όπως για παράδειγμα είναι η χιτίνη (πολυσακχαρίτης που περιέχεται στον εξωσκελετό), πρέπει να δίνεται προσοχή για τυχόν υπερεκτίμηση της πραγματικής περιεκτικότητας των πρωτεϊνών του εντόμου. Συνίσταται αντί για τη χρήση του συνήθους συντελεστή 6,25 να χρησιμοποιείται πιο κατάλληλα για μια σειρά εντόμων ο συντελεστής μετατροπής αζώτου σε πρωτεΐνη 5,60 (Hawkey et al., 2021). Η διατροφική αξία των πρωτεϊνών καθορίζεται από τη σύνθεση των αμινοξέων και την πεπτικότητα του πρωτεϊνικού κλάσματος του τροφίμου. Τα απαραίτητα αμινοξέα είναι η βασική παράμετρος για την αξιολόγηση της ποιότητας του τροφίμου (Costa-Neto & Dunkel, 2016; Gómez et al., 2019; A. Van Huis & Dunkel, 2017; Arnold Van Huis, 2013).

Τα ποσοστά της περιεχόμενης πρωτεΐνης για κάθε είδος εντόμου είναι θεμιτό να συγκριθούν με τα ποσοστά μη εναλλακτικών πηγών εξετάζοντας τη διατροφική αξία της πηγής. Η περιεκτικότητα ενός εντόμου σε πρωτεΐνες έχει ιδιαίτερη σημασία κατά την αξιολόγηση της εντομοφαγίας. Τα αποτελέσματα θα χαρακτηρίσουν την επιλογή απομόνωσης πρωτεϊνών από τα έντομα ως ωφέλιμη ή μη (Akhtar & Isman, 2018). Μερικά παραδείγματα περιεκτικότητας πρωτεϊνών σε έντομα δίνονται στον πίνακα 1.4. Πολλά είδη εντόμων φαίνεται να σημειώνουν μεγαλύτερα ποσοστά πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από αυτά σε σύγκριση άλλες συνήθεις πηγές που γράφονται στο τέλος του πίνακα.

Πίνακας 1.4 Απομονωμένες πρωτεΐνες ανά 100γρ ξηρού βάρους

ENTOMA	ΓΡΑΜΜΑΡΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΑΝΑ 100g ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ
Κάμπιες	50-60g
Φοινικοειδής σκαθάρι (προνύμφες)	23-36g
Ορθόπτερα	41-91g
Μυρμήγκια	7-25g
Τερμίτες	35-65g
Κουκούλι μεταξοσκώληκα	100g
Κάμπια μπαμπού <i>Omphisa fuscidentalis</i> <i>Hmps</i> (Lepidoptera: Crambidae)	77,5g
Γρύλος σπιπιού	68,7g
Ακρίδα <i>Sphenarium purpurascens</i> adult	35-49g
ΆΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	
Γαρίδα	13-28g

Ψητός μπακαλιάρος	28,5g
Βοδινός κιμάς	27,4g
Βόειο κρέας	35,8g

Πηγή:(Akhtar & Isman, 2018; Pal & Roy, 2014)

Η περιεκτικότητα και η πεπτικότητα των πρωτεϊνών δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως για όλα τα είδη εντόμων. Το ποσοστό περιεκτικότητας της ακατέργαστης πρωτεΐνης κυμαίνεται από 23-77% με την υψηλότερη να παρατηρείται στην ενήλικη ακρίδα. Η πεπτικότητα όταν μελετήθηκαν 78 διαφορετικά είδη σε διάφορες τάξεις αξιολογήθηκε ότι κυμαίνεται από 77% έως 98%. Παραδείγματα τα *T. molitor* και *H. illucens*, η φαινομενική πεπτικότητα των οποίων είναι 60% και 51%, αντίστοιχα (Hawkey et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, σημειώνονται τα εκχυλίσματα της ακατέργαστης πρωτεΐνης (crude protein, CP) αλλά και τα ποσοστά καθαρής πρωτεΐνης που ανακτώνται διότι υπάρχει η δυνατότητα οι πρωτεΐνες που θα απομονωθούν από τα CP να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση φυσικών και αισθητηριακών ιδιοτήτων και η καθαρή πρωτεΐνη για τη κάλυψη διατροφικών αναγκών. (Akhtar & Isman, 2018) Τα σκουλήκια της οικιακής μύγας έχουν περιεκτικότητα σε CP 40-60% ενώ οι προνύμφες μεγαλύτερης ηλικίας σημειώνουν λιγότερο εύρος. Τα αλευροσκούληκα από την άλλη έχουν μεγαλύτερο ποσοστό 47-60% παρόλη τη χαμηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο (Gómez et al., 2019).

Η τάξη των ορθόπτερων (ακρίδες, γρύλοι) είναι πλούσια σε πρωτεΐνες με περιεκτικότητα έως και 77% επί ξηρής ουσίας για διάφορα είδη ακρίδων (Akhtar & Isman, 2018). Η πρωτεΐνη της μαύρης στρατιωτόμυγας (*Hermetia illucens*) είναι πλούσια σε λυσίνη, 6-8% της CP. Η ακατέργαστη πρωτεΐνη του σκουληκιού της οικιακής μύγας είναι CP 40-60% και περιέχουν λυσίνη σε ποσοστό 5-8,2g/100g CP (Gómez et al., 2019).

Άξια αναφοράς είναι μια μελέτη στην οποία γίνεται σύγκριση της σύνθεσης των βρώσιμων εντόμων και του κρέατος όσον αφορά την ενεργειακή αξία, τις πρωτεΐνες, το λίπος των φυτικών ινών, τα λιπαρά οξέα, τα ανόργανα άλατα και τις βιταμίνες. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση 100g βρώσιμων εντόμων με 100g κρέατος (νωπό βάρος) με στόχο την εύρεση της καλύτερης πηγής θρεπτικών συστατικών λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας. Τα εδώδιμα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: γρύλος του σπιτιού, τριζόνια (*Acheta domesticus*), γρύλοι αγρού (*Gryllus bimaculatus* ενήλικα άτομα), σκώληκας

του αλεύρου (*Tenebrio molitor*), προνύμφες σούπερ σκουληκιού (*Zophobas morio*), προνύμφες κεροσκώληκα (*Galleria mellonella*), προνύμφες μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*) και προνύμφες κάμπιας μοπάνε (*Gonimbrasia belina*). Τα είδη κρέατος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αρνίσιο πόδι, μοσχαρίσιο πόδι, κρέας αλόγου, χοιρινή ωμοπλάτη, μοσχαρίσιο φιλέτο, σφάγιο κουνελιού, σφάγιο χήνας και πάπιας, και γαλοπούλα και στήθος και μπούτι κοτόπουλου (Orkusz, 2021).

Μετά το πέρας της έρευνας βρέθηκε πως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών συναντάται στις δυο ενήλικες μορφές του είδους *Tenebrio molitor* (24,13g/100g) και στις προνυμφικές μορφές των ειδών *Bombyx mori* (23,1g/100g), *Tenebrio molitor* (25,0g/100g) και *Gonimbrasia belina* (35,2g/100g). Το κρέας σημείωσε σε σύγκριση με τα έντομα χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τα επίπεδα των αμινοξέων τόσο του κρέατος όσο και των εντόμων δείχνουν πως και οι δύο πηγές χαρακτηρίζονται πλήρεις αφού περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στη σύνθεσή τους. Ο μεταξοσκώληκας και τα σφάγια χήνας είναι τα είδη που βρέθηκαν με τα χαμηλότερα επίπεδα όλων των απαραίτητων αμινοξέων. Τα αποτελέσματα δίνονται στους πίνακες 1.5 και 1.6 (Orkusz, 2021).

Πίνακας 1.5 Στοιχεία σύνθεσης απαραίτητων αμινοξέων βρώσιμων εντόμων και κρέατος (mg/100g βρώσιμη μερίδα)

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑМИΝΟΞΕΑ									
ΕΙΔΟΣ	Ile	Leu	Lys	Mth	Tryp	Phe	His	Thre	Val
Τριζόνι Ε	940	2050	1100	300	130	650	480	740	1070
Τριζόνι Π.	710	1270	1090	274	144	587	450	680	1050
<i>Gryllus bimaculatus</i> Ε.	920	1650	1140	350	220	740	520	810	1360
Σκώληκας του αλεύρου Ε.	1030	1960	1050	300	260	620	680	810	1500
Σκώληκας του αλεύρου Π.	835	1400	1070	400	216	654	559	770	1280
<i>Zophobas mori</i> Π.	881	1360	1070	255	203	740	600	780	1230
<i>Gonimbrasia belina</i> Π.	1300	1830	1460	410	480	1350	600	1840	1120
Μεταξοσκώληκας Π.	290	430	440	110	60	250	260	250	350
Πυραλίδες Π.	670	1240	920	440	140	600	360	590	840
Πόδι αρνιού	773	1195	1267	381	196	621	425	727	785
Μοσχαρίσιο μπούτι	826	1293	1349	413	174	660	551	688	853
Κρέας αλόγου	1457	2129	2240	627	226	853	627	874	1122

Χοιρινή ωμοπλάτη	821	1432	1483	487	235	699	584	966	927
Μοσχαρίσιο φιλέτο	997	1680	1844	560	232	911	706	951	1038
Σφάγιο κουνελιού	825	1277	1462	452	186	771	426	717	851
Σφάγιο χήνας	264	493	515	144	84	254	162	268	287
Σφάγιο πάπιας	391	611	686	214	95	329	250	370	479
Στήθος γαλοπούλας	915	1419	2015	522	248	703	537	994	953
Μπούτι γαλοπούλας	797	1233	1758	452	217	607	468	865	826
Στήθος κοτόπουλου	1251	1579	2022	631	360	772	941	911	1345
Κοτόπουλο μπούτι	982	1240	1590	497	283	606	739	715	1057

*Π.- προνυμφική μορφή, Ε.- ενήλικο έντομο, Ile-ισολευκίνη, Leu-λευκίνη, Lys-λυσίνη, Mth-μεθειονίνη, Cys-κυστίνη, Phe-φαινοαλανίνη, Tyr-τυροσίνη, Thre-θρεονίνη, Trp-τρυπτοφάνη, Val-βαλίνη.

Πηγή:(Orkusz, 2021)

Πίνακας 1.6 Στοιχεία σύνθεσης μη απαραίτητων αμινοξέων βρώσιμων εντόμων και κρέατος (mg/100g βρώσιμη μερίδα)

ΜΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ									
ΕΙΔΟΣ	Cys	Tyr	Ala	Aa	Ga	Gly	Pro	Ser	Arg
Τριζόνι Ε	170	1000	1800	1720	2150	1040	1150	1020	1250
Τριζόνι Π.	160	1100	1770	1390	2050	1060	1070	750	1360
Gryllus bimaculatus Ε.	160	1170	1930	1970	2440	1240	1250	1050	1140
Σκώληκας του αλεύρου Ε.	140	790	1810	1660	2280	2000	1500	980	1020
Σκώληκας του αλεύρου Π.	163	1370	1640	1520	2130	1040	1300	960	1380
Zorhobas mori Π.	175	1310	1440	1620	2440	950	1060	812	1290
Gonimbrasia belina Π.	110	974	1300	2234	4120	1100	876	1210	2410
Μεταξοσκώληκας Π.	80	300	360	610	900	510	310	340	380
Πυραλίδες Π.	210	880	1150	1490	1950	930	1240	1240	820
Πόδι αρνιού	198	512	1026	1362	2289	919	725	650	1068
Μοσχαρίσιο μπούτι	137	578	991	1514	2311	881	743	688	1074
Κρέας αλόγου	292	829	1212	1860	2735	964	896	943	1613
Χοιρινή ωμοπλάτη	207	622	1064	1540	2542	921	659	620	1085
Μοσχαρίσιο φιλέτο	265	746	1210	1862	3165	1007	783	835	1309
Σφάγιο κουνελιού	213	611	1010	1595	2738	851	851	691	1063

Σφάλιο χήνας	41	206	365	547	917	357	257	232	390
Σφάλιο πάπιας	104	280	589	752	1445	656	438	372	580
Στήθος γαλοπούλας	121	618	1191	1901	3246	941	813	826	1237
Μπούτι γαλοπούλας	105	536	1029	1647	2823	775	681	717	1065
Στήθος κοτόπουλου	279	735	1441	2157	3505	1334	1028	886	321
Κοτόπουλο μπούτι	220	578	1134	1694	2756	1049	809	697	1154

* P.- προνυμφική μορφή, E.- ενήλικο έντομο, His-ιστιδίνη, Ala-αλανίνη, Aa-ασπαρτικό οξύ, Ga-γλουταμινικό οξύ, Gly-γλυκίνη, Pro-προλίνη, Ser-σερίνη, Arg-αργινίνη.
Πηγή:(Orkusz, 2021)

1.3 Μικροοργανισμοί (Microorganisms)

Μια αναδύομενη πηγή πρωτεΐνης που μπορεί να καλύψει τις διατροφικές και αισθητηριακές ανάγκες των καταναλωτών είναι οι μικροοργανισμοί (Fasolin et al., 2019). Η ικανότητα τους να χρησιμοποιούν απλά οργανικά υποστρώματα για την ανάπτυξη τους προωθεί την καλλιέργεια σε βιομηχανική κλίμακα βρώσιμης μικροβιακής μάζας σε τοποθεσίες που δεν ανταγωνίζονται τη γεωργική παραγωγή, ενώ βοηθάνε στη σωστή διαχείριση των γεωργικών εισροών και στη μείωση της απώλειας τροφίμων (Linder, 2019).

Η μικροβιακή πρωτεΐνη αναφέρεται στις πρωτεΐνες που προέρχονται από μονοκύτταρους ή και πολυκύτταρους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιείται ως πηγή τροφίμων ή ζωοτροφών. Η μικροβιακή βιομάζα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, έως και 75% επί ξηρής βιομάζας, και περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες (ζύμες και νηματοειδείς μύκητες) και μικροφύκη (κυανοβακτήρια και μονοκύτταροι ευκαρυώτες). (Fasolin et al., 2019) Η παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης (MP) σε ελεγχόμενα και εντατικά συστήματα γνωστά ως βιοαντιδραστήρες γίνεται όλο και περισσότερο γνωστή στη βιομηχανία (Lippolis et al., 2019).

Η περιεκτικότητα σε μικροβιακή πρωτεΐνη και η ποιότητα αυτής είναι μεταβλητές και εξαρτώμενες από το είδος του μικροοργανισμού, τον τύπο του υποστρώματος, το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων, τις θρεπτικές πηγές και τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης. Αποτέλεσμα αυτού αποτελεί η θεώρηση των μικροοργανισμών ως πηγή πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας. Η πρωτεΐνη που απομονώνεται μπορεί να χαρακτηριστεί ως τρόφιμο ή ως

πρόσθετο, π.χ. συντηρητικό, χρωστική ουσία, με στόχο τη βελτίωση και τον εμπλουτισμό των παρασκευασμάτων τροφίμων (Fasolin et al., 2019).

Οι μύκητες (μονοκύτταροι ζυμομύκητες και νηματοειδείς) και τα μικροφύκη (τεχνηκή μορφή μικροφυκών και φωτοσυνθετικό είδος γνωστό ως κυανοβακτήριο) ανήκουν στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς ενώ τα βακτήρια αποτελούν άλλη κατηγορία των γνωστών μέχρι τώρα βασιλείων της ζωής των μικροοργανισμών (Linder, 2019).

1.3.1 Βακτήρια (Bacteria)

Η μικροβιακή πρωτεΐνη μπορεί να παραχθεί από βακτήρια οξειδωσης H_2 (HOB) ή και από μεθανότροφα βακτήρια. Η χρήση της οξειδωσης του υδρογόνου είναι μια αρκετά απαιτητική τεχνική αλλά πολλά υποσχόμενη για τη βιομηχανία των τροφίμων. Χρησιμοποιούνται κυρίως ανόργανες πηγές άνθρακα (CO_2) και ηλεκτρονίων (H_2) για τη παραγωγή της απαραίτητης βιομάζας. Η μείωση του αποτυπώματος του άνθρακα, που προκύπτει από την οξειδωση, συμβάλλει στον απώτερο σκοπό της βιομηχανίας για καινοτόμες πράσινες μεθόδους λιγότερο επιβλαβείς. Η πρωτεΐνη που παράγεται σε αντιδραστήρες σημειώνει χαμηλότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα από τις φυτικές ή ζωικές πρωτεΐνες και χαμηλότερο κόστος παραγωγής (Lippolis et al., 2019).

Τα μεθανότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν το μεθάνιο (CH_4) ως ενέργεια και σε αντίθεση με τη παραγωγή HOB έχει αναπτυχθεί πολύ στη βιομηχανική κλίμακα. Ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα για τη τεχνική αυτή και συγκρίνεται με τα οφέλη του ιχθυάλευρου (περιεκτικότητα και θρεπτική αξία) (Lippolis et al., 2019).

1.3.2 Μύκητες (Fungus)

Οι μικροβιακές πρωτεΐνες που προέρχονται από μύκητες, γνωστές και ως μυκοπρωτεΐνες, αποτελούν υποκατάστατα μερικώς ή εξ ολοκλήρου πρωτεϊνούχων τροφίμων όπως το κρέας (Hashempour-Baltork et al., 2020). Η μυκοπρωτεΐνη παράγεται μέσω μιας διαδικασίας ζύμωσης στερεάς, ημιστερεάς ή βυθισμένης κατάστασης με την υποβρύχια να εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση (Landeta-Salgado et al., 2021). Σε αντίθεση με την HOB, οι μύκητες χρειάζονται μια οργανική πηγή άνθρακα (όπως είναι τα σάκχαρα) γλυκό νερό και καλλιεργήσιμη γη για την ανάπτυξή τους. Η

παραγωγή αυτών σημειώνει μεγαλύτερη βιωσιμότητα από τη παραγωγή του κρέατος. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη πως η μυκοπρωτεΐνη αποτελεί πηγή πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας, με τη παρουσία όλων των απαραίτητων αμινοξέων, με βιολογική αξία συγκρίσιμη με αυτή των πρωτεϊνών γάλακτος. Στον πίνακα 1.7 δίνονται διαφορές της μυκοπρωτεΐνης με το κρέας (Lippolis et al., 2019).

Τυπικά 100g ξηρής μυκοπρωτεΐνης περιέχουν 45g πρωτεΐνης και η αγορά της αναμένεται να αυξηθεί κατά 20% μέσα στον επόμενο χρόνο (Lippolis et al., 2019). Η βαθμολογία αμινοξέων (AA) διορθωμένης πεπτικότητας πρωτεϊνών για τις μυκοπρωτεΐνες είναι σχεδόν 1,0. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διατροφική αξία των μυκοπρωτεϊνών και τη σύνθεσή τους είναι οι τύποι των μικροοργανισμών και των υποστρωμάτων και οι μέθοδοι συγκομιδής, ξήρανσης και επεξεργασίας τους (Hashempour-Baltork et al., 2020).

Ευρέως διαδεδομένο παράδειγμα μυκοπρωτεϊνών από νηματοειδείς μύκητες αποτελεί το Quorn. Η καλλιέργεια του *Fusarium venenatum* σε αποστειρωμένες συνθήκες δημιουργεί μια πάστα που ονομάζεται μυκοπρωτεΐνη περίπου 50% περιεκτικότητας σε ξηρό βάρος (Hashempour-Baltork et al., 2020; Lippolis et al., 2019). Τα προϊόντα Quorn διατίθενται ως κιμάς χωρίς κρέας, κύβοι κοτόπουλου κ.α. (Mistry et al., 2020).

Πίνακας 1.7 Συνολική σύγκριση της μυκοπρωτεΐνης με το κρέας

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ		ΜΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗ (νωπό βάρος)	ΚΡΕΑΣ
Διατροφή (ανά 100 g)			
Υγρασία (g)		75	73,1
Πρωτεΐνη (g)		11,25	23,2
Λίπος (g)		3,25	2,8
Φυτικές ίνες (g)		6,25	0
Υδατάνθρακες (g)		3	0
Ενέργεια (kcal)		85	191,3
Τέφρα (g)		3,4	-
Απαραίτητα αμινοξέα (g/100g)	Ιστιδίνη	0,39	0,66
	Ισολευκίνη	0,57	0,87
	Λευκίνη	0,95	1,53
	Λυσίνη	0,91	1,60
	Μεθειονίνη	0,23	0,50
	Φαινυλαλανίνη	0,54	0,76
	Τρυπτοφάνη	0,18	0,22
	Θρεονίνη	0,61	0,84

	Βαλίνη	0,60	0,94
Σύνθεση λιπαρών οξέων (g/100 g)	Παλμιτικό (16:0)	1,3	0,607
	Στεατικό (18:0)	0,2	0,356
	Ολείκό (18:1)	1,4	1,103
	Λινολεϊκό(18:2)	4,3	0,204
	Λινολενικό(18:3)	4,9	0,048
Βιταμίνη (mg/kg)	Θειαμίνη	0,4	0,0004
	Νιασίνη	14	0,5
	Ριβοφλαβίνη	9	0,018
	Πυριδοξίνη	5	0,052
	Παντοθενικό οξύ	10	0,035
	Φολικό οξύ	0,4	
	Βιοτίνη	0,6	
Μείωση εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα 2012-15 (%)		15	-
Αποτύπωμα νερού ανά μονάδα βάρους (L/kg)		777	15415
Χρήση γης ανά κιλό προϊόντος (ha/kg)		0,00017	0,0035-0,0049
Αποδοχή αγοράς	Ικανότητα μαζικής παραγωγής	Ναι	Ναι, αλλά φτάνοντας περιορισμούς
	Κόστος	Χαμηλό	Αυξανόμενο
	Κυβερνητικός κανονισμός	Επιδότησεις, τυπικός κανονισμός	Επιδότησεις, δυνατότητα για ρυθμίσεις
Αντιμετώπιση ανησυχιών για ευημερία		Ναι	Όχι
Αποδοχή από καταναλωτές		Προβλήματα γευστικότητας	Αυξανόμενη ζήτηση
Ασφάλεια		Μείωση των τροφιμογενών ασθενειών	Αμετάβλητη
Αξία παγκόσμιας αγοράς (δισεκατομμύρια ευρώ)		0,214	
Τιμή ανά μονάδα πρωτεΐνης (\$/kg πρωτεΐνης DM)		-	10,8

Πηγή: (Hashempour-Baltork et al., 2020)

1.3.3 Μικροφύκη (Microalgae)

Τα μικροφύκη αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που βρίσκονται σε θάλασσα και περιβάλλοντα γλυκού νερού (Barros de Medeiros et al., 2021). Έχουν μέγεθος λίγων έως αρκετών εκατοντάδων μικρομέτρων ανάλογα με τη κατηγορία και το είδος τους. Η κυτταρική δομή που διαθέτουν είναι λιγότερο εξελιγμένη και το σύνθητες περιβάλλον που αναπτύσσονται θεωρείται το υδατικό με πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Η απόρροια των φωτοσυνθετικών αυτών μηχανισμών είναι η αποτελεσματική φωτοαυτότροφη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα

(Kratzer & Murkovic, 2021). Τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τις ανθρωπογενείς εκπομπές ως πηγές θρεπτικών ουσιών μετατρέποντάς μικρά μόρια όπως διοξείδιο του άνθρακα και αμμώνιο σε μακρομόρια προστιθέμενης αξίας όπως είναι οι πρωτεΐνες (Amorim et al., 2021).

Οι πρωτεΐνες των μικροφυκών συναντώνται σε διάφορα μέρη του κυττάρου όπως το κυτταρόπλασμα, τα οργανίδια, τα πλαστίδια, το κυτταρικό τοίχωμα και τον πυρήνα (Amorim et al., 2021). Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε διάφορα είδη μικροφυκών που βρίσκεται ότι κυμαίνεται σε εύρος 40-70% αποτελεί σημαντικό λόγο για τον χαρακτηρισμό αυτών ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών (Soto-Sierra et al., 2018). Η υψηλή περιεκτικότητα σε σχέση με τις συμβατικές πηγές (π.χ. 55-70% για το *S. platensis* και 42-55% για το *C. vulgaris* ανά ξηρή ύλη (Barros de Medeiros et al., 2021), το κυανοβακτήριο *Arthrospira* μπορεί να περιέχει έως και 70% πρωτεΐνη (Saadaoui et al., 2021)) και η ποιότητα των αμινοξέων υπογράμμισαν τη σημαντικότητα της βιομάζας των μικροφυκών και βοήθησαν στην ένταξη τους ως δυνητικό συστατικό στη βιομηχανία τροφίμων (Barros de Medeiros et al., 2021).

Σε διάφορες βιομηχανικές χρήσεις παρατηρείται η ύπαρξη των μικροφυκών όπως η παραγωγή βιοντίζελ, η βιοεξυγίανση υγρών αποβλήτων, η παραγωγή ζωοτροφών και σε προϊόντα διατροφής. Στην πτυχιακή εργασία δίνεται μεγαλύτερη σημασία στις δύο τελευταίες κατηγορίες. Η βιομάζα μικροφυκών και τα παράγωγά της (εκχυλίσματα και απομονωμένες ενώσεις) χρησιμοποιούνται σε διάφορες λειτουργίες όπως φυσικές χρωστικές ουσίες και συντηρητικά με σκοπό να βελτιώσουν την υγεία του καταναλωτή και το διατροφικό προφίλ των τροφίμων, και να βελτιώσουν τις τεχνολογικές ιδιότητες των προϊόντων (Barros de Medeiros et al., 2021).

Οι βιομηχανικά αξιοσημείωτοι μικροοργανισμοί είναι τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια και τα ευκαρυωτικά μικροφύκη (τα διάτομα (diatoms) που ζουν στους ωκεανούς) τα χρυσά και ορισμένα είδη πράσινων μικροφυκών που ζουν στο γλυκό νερό. Τα κυανοβακτήρια (Cyanophyceae ή γαλαζοπράσινα φύκη) περιλαμβάνουν τα γνωστά είδη *Spirulina* *Arthrospira platensis* και *Arthrospira maxima* (ή αλλιώς *Spirulina platensis* και *Spirulina maxima*). Η πράσινη άλγη *Haematococcus pluvialis* του γλυκού νερού είναι εμπορικά σημαντική ως πηγή ασταξανθίνης, η *Chlorella vulgaris* ως συμπληρωματικό

προϊόν διατροφής ή συστατικό τροφίμων και το αλογόφιλο φύκος *Dunaliella salina* ως πηγή β-καροτενίου. (Kratzer & Murkovic, 2021) Η *Spirulina platensis* και η *Chlorella vulgaris* είναι ευρέως τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα είδη (Barros de Medeiros et al., 2021).

Μερικά παραδείγματα των ειδών μικροφυκών που συνήθως χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζωοτροφών είναι *Arthrospira platensis*, *Dunaliella salina*, *Hematococcus pluvialis*, *Chlorella* sp., *Nannochloropsis granulate* και *Tetraselmis chui* (Saadaoui et al., 2021).

Το μεγάλο ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τα μικροφύκη οφείλεται στα πολλά πλεονεκτήματά τους. Ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης, οι απλές απαιτήσεις καλλιέργειας (ηλιακή ακτινοβολία, νερό, διοξείδιο του άνθρακα και ανόργανα θρεπτικά συστατικά) και ικανότητα για επιβίωση σε δυσμενείς συνθήκες (Barros de Medeiros et al., 2021). Ο χαρακτηρισμός τους ως την αντιπροσωπευτική πηγή ανεκμετάλλευτων ενώσεων που έχουν μοναδικές ιδιότητες και ενδιαφέρουσες εφαρμογές με κύριο όφελος τη βελτιστοποίηση της υγείας του καταναλωτή. Η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ένα από τα παραδείγματα, το οποίο τελικά θα συμβάλλει στη μείωση των αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία και την υδατοκαλλιέργεια. Τα μικροφύκη παράγουν επίσης βιοενεργά πεπτίδια με αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές ιδιότητες, αντιπηκτικές, αντικαρκινικές και ανοσομιμητικές ιδιότητες (Saadaoui et al., 2021).

Η χρήση των μικροφύκη βέβαια παρουσιάζει και μειονεκτήματα. Οι αυστηρότεροι περιορισμοί στις προδιαγραφές που σχετίζονται με την ποιότητα, την ασφάλεια και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων είναι ένα από αυτά. Το βασικό μειονέκτημα της εναλλακτικής πηγής όμως αποτελεί το υψηλό κόστος λειτουργίας, υποδομής και συντήρησης των εγκαταστάσεων που απαιτούνται για την καλλιέργεια και τη λήψη βιομάζας, την επιλογή των στελεχών προέλευσης πρωτεϊνών, καθώς και τη συγκομιδή και την αφυδάτωση σε εμπορική κλίμακα. Η χρηματοπιστωτική αγορά και η αξιοπιστία των στατιστικών στοιχείων σχετικά με τις ευκαιρίες της αγοράς μικροφυκών επισημαίνονται ως περιοριστικοί παράγοντες για την πραγματική αξιολόγηση του δυναμικού αυτών των μικροοργανισμών (Barros de Medeiros et al., 2021).

Επιπλέον, η καλλιέργεια μικροφυκών είναι γνωστό πώς είναι δαπανηρή επειδή γίνεται σε ειδικά και πολύπλοκα συστήματα που διατηρούν τα κύτταρα μικροφυκών σε υψηλούς ρυθμούς παραγωγικότητας βιομάζας και βιοενώσεων. Το κόστος αυτό συνδέεται επίσης με την υψηλή κατανάλωση ενέργειας ορισμένων μεταγενέστερων διεργασιών, όπως η ξήρανση της βιομάζας και η εκχύλιση λιπιδίων (Amorim et al., 2021). Η χρήση βιομάζας μικροφυκών τέλος μπορεί να εγείρει ορισμένες ανησυχίες σχετικά με την τοξικότητα, κυρίως λόγω της παρουσίας τοξινών, βαρέων μετάλλων ή παθογόνων μικροοργανισμών που προκύπτουν από τις συνθήκες καλλιέργειας και παρασκευής (Barros de Medeiros et al., 2021).

Από τα μικροφύκη συλλέγονται πρωτεϊνικά προϊόντα που ταξινομούνται σύμφωνα με τη περιεκτικότητά τους και τον βαθμό εξευγενισμού τους. Αυτά είναι οι πρωτεΐνες ολικών κυττάρων, οι συμπυκνωμένες πρωτεΐνες, οι απομονωμένες πρωτεΐνες, οι υδρολυμένες πρωτεΐνες και τα βιοδραστικά πεπτίδια. Το κύριο εμπόδιο που συναντάται σε κάθε περίπτωση είναι η παρουσία κυτταρικού τοιχώματος που εμποδίζει την πρόσβαση στις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Αυτό διασπάται με τις κατάλληλες μεθόδους όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των διεργασιών (Barros de Medeiros et al., 2021; Soto-Sierra et al., 2018).

2. Διεργασίες απομόνωσης

2.1 Συμβατικές ξηρές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Conventional dry proteins extraction methods)

Ξηρές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Conventional dry proteins extraction methods) χαρακτηρίζονται οι τεχνικές κοσκινίσεως και/ή αεροταξινόμηση. Τα μειονεκτήματα αυτών των διεργασιών είναι η παρουσία ακαθαρσιών και η συσσωμάτωση σωματιδίων στο τέλος της διαδικασίας. Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προτάθηκαν νέες τεχνικές, όπως αυτή του ηλεκτροστατικού διαχωρισμού. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Αρχικά, απαιτείται η φόρτιση των μορίων στο ηλεκτρικό πεδίο και ακολουθεί η χρήση τριβο-ηλεκτροστατικής μεθόδου διαχωρισμού στο άλευρο του οσπρίου, παράδειγμα φυτικής πηγής πρωτεϊνών σε συνδυασμό με

υδατάνθρακες, με ποσοστό 15% υψηλότερο από αυτό της απομόνωσης πρωτεϊνών από τη διεργασία της αεροταξινόμησης (Pojić et al., 2018).

Οι Barakat, Jerome, and Rouau το 2015 χρησιμοποίησαν υπέρλεπτο άλεσμα με ηλεκτροστατικό διαχωρισμό, μια διαδικασία κλασμάτωσης στην οποία απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες διαχωρισμένες από τη λιγνίνη, τις πολυφαινόλες και τους πολυσακχαρίτες με απουσία βοήθειας διαλύτη, (βιο)καταλύτη ή κάποιας μορφής θέρμανσης. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος με εφαρμογή στην επεξεργασία του φλοιού των σπόρων δημητριακών. Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε πίτα ή άλευρο ηλιέλαιου, ως υπόστρωμα, διότι σε ορισμένες πτυχές παρατηρούνται παρόμοιες δομικές ιδιότητες με τα περιβλήματα των σπόρων των δημητριακών. Τελικά, βρέθηκε πως κατά τη διαδικασία η χημική ακεραιότητα των υδατανθράκων και της λιγνίνης σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα παραμένει αμετάβλητη δίχως παρουσία απόβλητων (Barakat et al., 2015).

Στη περίπτωση των εντόμων παράδειγμα εκχύλισης πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας από ξηρή κλασμάτωση αποτελεί ο σκώληκας του αλεύρου *Tenebrio molitor* L. Η ξηρή κλασμάτωση διαφοροποίησε τη χημική σύνθεση των πρωτεϊνών που εξάγονται από προνύμφες σκώληκα του αλεύρου και οδήγησε σε βελτιωμένες διατροφικές και λειτουργικές ιδιότητες (J. H. Lee et al., 2021). Η μύγα του μαύρου στρατιώτη που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ξήρανση 60°C και ξήρανση με μικροκύματα στη μορφή των προνυμφών σημείωσε αναλογία απαραίτητων αμινοξέων προς τα ολικά αμινοξέα σε ποσοστό άνω του 40%(Mondor & Lalanne, 2021).

2.2 Συμβατικές υγρές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Conventional wet proteins extraction methods)

Οι υγρές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Conventional wet proteins extraction methods) μπορούν να πραγματοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών είτε με διαλύτες χημικούς, οργανικούς, όξινους, βασικούς ή και το νερό, είτε με τη συμβολή ενζύμων, με υποκρίσιμη εκχύλιση νερού, αντίστροφη εκχύλιση μικκυλίων ή με εκχύλιση διφασικών συστημάτων. Με τη χρήση ενός μέσου με τιμές pH διαφορετικές από αυτές του ισοηλεκτρικού σημείου

παρατηρούνται τα πρώτα στάδια εκχύλισης των πρωτεϊνών. Έπειτα με τη χρήση ενός μέσου με τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών καταβυθίζονται και διαχωρίζονται από το σύνολο. Σε άλλες περιπτώσεις η καταβύθιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με διαδικασίες όπως η υπερδιήθηση και η διαδιήθηση, προτού ξηραθεί, όπως όταν χρησιμοποιούνται αλατούχα διαλύματα. Σε περίπτωση χρήσης όξινου μέσου επειδή το pH είναι πολύ κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο η πρωτεΐνη που καταβυθίζεται χαρακτηρίζεται λιγότερο διαλυτή και διαθέτει μικρότερο καθαρό φορτίο από το επιθυμητό. Βέβαια μέθοδοι με ακραίες συνθήκες pH ,αλκαλικές ή και όξινες, έχουν τη δυνατότητα μετουσίωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης οπότε επιλέγονται άλλες καινοτόμες μέθοδοι όπως αυτή του συνδυασμού του νερού με τα ένζυμα. Η χρήση του συνδυασμού αυτού και οι υποκρίσιμες συνθήκες και η εκχύλιση πρωτεϊνών με αντίστροφα μικκύλια είναι ενδιαφέρουσες για βιομηχανικές εφαρμογές (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

2.2.1 Χημική εκχύλιση (Chemical extraction)

Στη χημική εκχύλιση (Chemical extraction) πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διαλύτης κατάλληλος ώστε να απομονωθούν οι επιθυμητές πρωτεΐνες. Αυτός μπορεί να είναι νερό, οργανικός, αλκαλικός και όξινος διαλύτης. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται απολίπανση του δείγματος, εκχύλιση αυτού και καθίζηση για την αποκοπή της πρωτεΐνης από το σύνολο. Στην απολίπανση χρησιμοποιούνται διαλύτες για τη απομάκρυνση ενώσεων που θα σταθούν εμπόδιο κατά την εκχύλιση. Τέτοιοι διαλύτες είναι ο πετρελαϊκός αιθέρας, το n-εξάνιο και το n-πεντάνιο. Τα άλας NaCl , ιοντικά απορρυπαντικά (SDS) και μη (NP-40 και Triton X100) κάτω από ζεστό ή κρύο νερό ή και οργανικοί διαλύτες όπως αιθανόλη, μεθανόλη, φαινόλη, ουρία, Tris-HCl πραγματοποιούν την εκχύλιση των πρωτεϊνών. Τέλος, σημειώνεται καταβύθιση της πρωτεΐνης, η οποία περιλαμβάνεται μέσα στο ίζημα, το οποίο περιέχει και ανεπιθύμητες προσμίξεις. Οι προσμίξεις κατά βάση απομακρύνονται με φυγοκέντριση χωρίς βέβαια να καθιστούν πλήρως καθαρή τη τελική πρωτεΐνη. Για τη δημιουργία ιζήματος γίνεται χρήση χημικών ή διαλυτών όπως θειικό αμμώνιο, αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, κιτρικό οξύ κ.α. (Kumar et al., 2021).

Το 2017 οι Lee et al. εξέτασαν τη διεργασία διάσπασης των κυττάρων και την ανάκτηση πρωτεϊνών από υγρή *Chlorella vulgaris* και απέδειξαν ότι η ανάμιξη ακετόνης και τριχλωροοξικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιτυχή καταβύθιση πρωτεϊνών (S. Y. Lee et al., 2017).

Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (Organic solvents), αλκαλικούς και όξινους, αποτελεί μια ευρέως γνωστή διαδικασία λόγω της υψηλής διαλυτότητας και σταθερότητας των εκχυλισμένων πρωτεϊνών από εναλλακτικές πηγές. Οι οργανικοί διαλύτες που λαμβάνουν μέρος όπως η αιθανόλη, η βουτανόλη, η ακετόνη συμβάλλουν στην τελική παραλαβή μιας καθαρής πρωτεΐνης. Δυστυχώς το ίδιο δεν μπορεί να ειπωθεί κατά τη χρήση όξινων διαλυτών για εκχύλιση πρωτεϊνών αφού προκύπτουν πρωτεΐνες κατώτερης ποιότητας (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, συγκεκριμένα με τη χρήση εξάνιου, μπορεί να συμβάλλει στο διαχωρισμό πρωτεϊνών από τα λίπη/ έλαια των εντόμων ενώ ο συνδυασμός αυτής της μεθόδου υποβοηθούμενης από μικροκύματα αποτελεί καινοτόμο τεχνολογία για την απομόνωση πρωτεϊνών από το λίπος των εντόμων (Gómez et al., 2019). Μέσω διεργασιών απολίπανσης με εξάνιο οι πρωτεΐνες που εξάγονται από τα τρία εδώδιμα είδη εντόμων *T. molitor*, *Allomyrina dichotoma*, και *Protaetia brevitarsis* παρουσίασαν βελτιωμένη ικανότητα αφρισμού κατά 40% και μεγαλύτερη σταθερότητα κατά 40 λεπτά. (J. H. Lee et al., 2021)

Η εκχύλιση με νερό (υδατική εκχύλιση) συναντάται στη προσπάθεια διαχωρισμού μεγάλων αδιάλυτων σωματιδίων χιτίνης από αλεσμένα έντομα (Gómez et al., 2019). Η χρήση της όμως ακολουθούμενη από διαχωρισμό του λίπους μεταξύ των πέντε ειδών εντόμων οδήγησε στο συμπέρασμα πως ανάλογα με το είδος του εντόμου αλλάζουν και τα ποσοστά ανάκτησης των πρωτεϊνών (Bose et al., 2021).

Αντιθέτως, η γνωστή αλκαλική εκχύλιση πρωτεϊνών δίδει διαφορετικά αποτελέσματα, διότι επιδρά στους Σ δισουλφιδικούς δεσμούς λόγω του διατηρηθέντος βασικού pH. Αλκάλια, όπως το NaOH και το KOH, προάγουν μέγιστη απόδοση στη μέθοδο αυτή. Ένας ακόμη λόγος της μεγάλης απόδοσης της μεθόδου είναι ο υψηλός βαθμός διαλυτότητας των πρωτεϊνών που συναντάται σε υψηλές τιμές pH του διαλύτη επειδή ιοντίζονται τα

ουδέτερα και τα όξινα αμινοξέα. Με συνεχή προσοχή στην ισορροπία μεταξύ της ισχύος του αλκαλίου και της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης είναι δυνατή η ανάκτηση μη επηρεασμένων από τη μέθοδο εκχυλισμένων πρωτεϊνών. Η αλκαλική εκχύλιση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη συμβατική μέθοδος για την εκχύλιση πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης και από μικροφύκη (Kumar et al., 2021; Rojić et al., 2018; Timira et al., 2021).

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών, διότι σταθεροποιεί τη δομή της πρωτεΐνης και την αναδίπλωση της και βοηθά στη διατήρηση των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων εντός της πρωτεϊνικής δομής. Η πρωτεΐνη υδρολύεται σε ολιγοπεπτίδια σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 140°C εξαιτίας της θερμικής ενέργειας. Παραδείγματα αλκαλικής εκχύλισης σε φυτικές πηγές δίνονται στον πίνακα 2.1 (Kumar et al., 2021; Rojić et al., 2018).

Η χημική εκχύλιση που λαμβάνει χώρα σε μάζες μικροφυκών χρησιμοποιεί όξινους διαλύτες, όπως υδροξείδιο του νατρίου, θειικό οξύ, οξικό οξύ, οξυζενέ και νιτρικό οξύ, για να σπάσει το τοίχωμα και τους δεσμούς που συντελούν ώστε να έχει πρόσβαση ο διαλύτης. Ο όξινος διαλύτης σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των κυττάρων σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Βέβαια προσοχή πρέπει να δίνεται γιατί η παρουσία υψηλών βαθμών θερμοκρασίας μπορεί να επιφέρει καταστροφές στα θρεπτικά συστατικά της εναλλακτικής πηγής (Timira et al., 2021).

Μελέτες συμπέραναν ότι κάποιες συνθήκες όπως η αναλογία δείγματος προς το διαλύτη, η συγκέντρωση του αλκαλίου, το χρονικό διάστημα και η θερμοκρασία έχουν τη δυνατότητα βελτίωσης με στόχο τη μέγιστη απόδοση πρωτεΐνης σε χαμηλό κόστος (Rojić et al., 2018). Οι Salgado et al. με τη χρήση της αλκαλικής μεθόδου εκχύλισης πρωτεϊνών στο αλεύρι ηλίανθου με βελτιστοποιημένες συνθήκες αναλογία ηλίανθου / νερού 67g/L, χρόνος εκχύλισης 1 ώρα και pH=9 ακολουθούμενη από εκχύλιση με τη χρήση καταβύθισης ισοηλεκτρικού σημείου και ξήρανση με ψεκασμό σημείωσαν ποσοστό ανάκτησης πρωτεΐνης ίσο με 70,4% σε βάση ξηρού βάρους (Salgado et al., 2012). Οι (Xiang et al., 2017) με θερμο-αλκαλική εκχύλιση σε ενεργό ιλύ πέτυχαν ποσοστό ανάκτησης πρωτεΐνης ίσο με 69%. Οι

βελτιστοποιημένες συνθήκες ήταν χρόνος εκχύλισης 2 ώρες, χρόνος παραμονής της ιλύος 21 ημέρες και pH=12 στους 130°C (Kumar et al., 2021).

Κατά την επεξεργασία ακρίδας (*Schistocerca gregaria*) και μέλισσας (*Apis mellifera*) αρχικά με απολίπανση ακολουθούμενη από εκχύλιση σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα και επεξεργασία με υπερήχους σημειώνει ποσοστά ανάκτησης πρωτεΐνης έως και 57,5% και 55,2% αντίστοιχα. Η απολίπανση είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι οι ιστοί των εντόμων περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, λιπαρών οξέων, βιταμινών και ανόργανων οξέων τα οποία εμποδίζουν την εκχύλιση των πρωτεϊνών (Bose et al., 2021). Σημειώθηκε ακόμη, με τη χρήση των παραπάνω τεχνικών, βελτιστοποίηση στις αφριστικές και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες των δυο εντόμων κατά 10-40% (J. H. Lee et al., 2021).

Ακόμη οι (Safi et al., 2017) στους μικροοργανισμούς *Nannocloropsis oculata* και *Chlorella vulgaris* με αλκαλική επεξεργασία στους 40°C για 2 ώρες σημείωσαν ποσοστό ανάκτησης πρωτεϊνών 31,1% και 33,2% αντίστοιχα (Timira et al., 2021).

Έχουν χαρακτηριστεί ικανοποιητικές οι αποδόσεις πρωτεϊνών από τη χρήση αλκαλικών διαλυμάτων κατά την απομόνωση πρωτεϊνών από αλεύρι εντόμων όπως για τη μεταναστευτική ακρίδα, την ακρίδα της ερήμου, το γρύλο σπιτιού, τον σκώληκα του αλεύρου και τη μαύρη μύγα στρατιώτη. Το pH συγκεκριμένα για τα έντομα οδηγεί σε υψηλότερη διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε τιμές με εύρος 10 έως 12. Παρόλα αυτά η χρήση χημικών διαλυτών εμφανίζει αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών όπως στις αφριστικές και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες που έχει (Ojha et al., 2021).

2.2.2 Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (Subcritical water extraction)

Η εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (Subcritical water extraction) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί το νερό στην υγρή του φάση, όταν δηλαδή είναι ζεστό στο εύρος θερμοκρασιών 100-374°C κάτω από υψηλή πίεση. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία μειώνεται η διηλεκτρική σταθερά του νερού και αποκτά την ικανότητα διάσπασης των υδρόφοβων ουσιών. Έχει βρεθεί από μελέτες πως το υποκρίσιμο νερό μπορεί να λειτουργεί σαν καταλύτης οξέων ή βάσεων στις χημικές τους αντιδράσεις επειδή η σταθερά διάσπασης αυτού είναι

μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη του νερού του περιβάλλοντος για τα ιόντα υδρογόνου και υδροξυλίου (Pojić et al., 2018).

Σε μια έρευνα που έγινε το 2016 από τους Lu et al. χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό με σκοπό τη παρασκευή απομονωμένων πρωτεϊνών σόγιας πλούσιων σε ισοφλαβόνες από θερμικά μετουσιωμένα παρασκευάσματα σόγιας. Για τη διεκπεραίωση αυτής έγινε χρήση βοηθητικής ενζυμικής υδρόλυσης. Από την έρευνα βρέθηκε πιο αποτελεσματική η χρήση υποκρίσιμου νερού με τη βοήθεια ενζύμων (59,3%) έπειτα από σύγκριση των τιμών της απόδοσης της σε σχέση με αυτή της συμβατικής αλκαλικής (pH 9,0) και όξινης κατακρήμνισης (pH 4,5) (16,4% στους 25°C) στο θερμικά μετουσιωμένο αλεύρι σόγιας (Lu et al., 2016)

2.2.3 Εκχύλιση αντίστροφων μικκυλίων (Reverse micelles extraction (RM))

Η εκχύλιση αντίστροφων μικκυλίων (Reverse micelles extraction (RM)) βρίσκει εφαρμογή στις προσπάθειες εκχύλισης πρωτεϊνών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις φυτικές πηγές. Στη μέθοδο -υπάρχουν αντίστροφα μικκύλια (συσσωματώματα επιφανειοδραστικών μορίων που μετρούνται σε νανόμετρα) τα οποία έχουν εσωτερικούς πυρήνες μορίων νερού σε μη πολικούς διαλύτες με αποτέλεσμα το νερό που κατακτά το εσωτερικό αυτών να βοηθά στη διάσπαση των υδρόφιλων βιομορίων όπως και στις πρωτεΐνες. Για αποφυγή οποιασδήποτε μετουσίωσης του συστήματος τα αντίστροφα μικκύλια δημιουργούν ένα τριφασικό σύστημα, νερό-επιφανειοδραστικό-οργανικός διαλύτης. Στην περίπτωση της εκχύλισης από φυτικές πηγές πραγματοποιούνται δύο βήματα, η πρόσθια ή προς τα εμπρός εκχύλιση (με κατεύθυνση από το εσωτερικό προς το εξωτερικό περιβάλλον) και η ανάστροφη εκχύλιση. Η δεύτερη βέβαια δεν αποτελεί μια απλή αντιστρεπτή διαδικασία της πρώτης λόγω της θερμοδυναμικής της. Στην πρόσθια ή προς τα εμπρός εκχύλιση το διάλυμα των αντίστροφων μικκυλίων διαλύει τις πρωτεΐνες παρότι επηρεάζεται από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση που έχει με την πρωτεΐνη, το pH, την ιοντική ισχύ, τη φύση και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης-στόχου (Pojić et al., 2018).

Πίνακας 2.1 Παραδείγματα φυτικών πηγών στα οποία πραγματοποιείται αλκαλική εκχύλιση.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
Τσάι	0,5M NaOH	pH:12 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/50 w/v θερμοκρασία:70°C χρόνος:60min	89,70% πρωτεΐνη που ανακτάται με χρήση αμμωνίου θειική καταβύθιση
Βαμβακόσπορος	0,1N KOH	pH:12,5 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/2 w/v θερμοκρασία:60°C χρόνος:40min	>70% ανάκτηση πρωτεϊνών σε βέλτιστες συνθήκες
Φτερωτό Φασόλι	1N NaOH	pH:12 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/15 w/v θερμοκρασία:RT χρόνος:45min	94,80% ανάκτηση πρωτεϊνών σε βέλτιστες συνθήκες
Σπόροι κόκκινης πιπεριάς	0,5M NaOH	pH:8,8 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/21 w/v θερμοκρασία:31°C χρόνος:20min	<12,24% ανάκτηση πρωτεϊνών σε βέλτιστες συνθήκες
Τομάτα	0,5M NaOH	pH:9 ή 11 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/30 w/v θερμοκρασία: RT χρόνος:60min	26,29%* / 32,56**
Ρύζι	0,01M NaOH	Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/15 w/v θερμοκρασία:35°C χρόνος:120min	15198,07mg/kg
Σπόροι acacia tortillis	1M NaOH	pH: 11 Δείγμα προς αναλογία διαλύτη:1/20 w/v θερμοκρασία: RT χρόνος:120min	91,80% απομονωμένη πρωτεΐνη που ανακτάται με ευνοϊκές λειτουργικές ιδιότητες

*με διεργασία θερμού σπασίματος **με διεργασία ψυχρού σπασίματος

Πηγή: (Kumar et al., 2021)

Η ανάδρομη ή προς την αντίθετη φορά εκχύλιση έχει ως σκοπό την ανάκτηση των διαλυμένων πρωτεϊνών που υπάρχουν στο διάλυμα με αλλαγές στο pH

και την ιοντική ισχύ. Το χαμηλό κόστος της μεθόδου λόγω της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης των επιφανειοδραστικών και οργανικών διαλυτών προσφέρει ένα ακόμη πλεονέκτημα στα ήδη υπάρχοντα. Η σπάνια μετουσίωση των πρωτεϊνών κατά την εκχύλιση τους βοηθά στην επιλογή της διαδικασίας (Pojić et al., 2018).

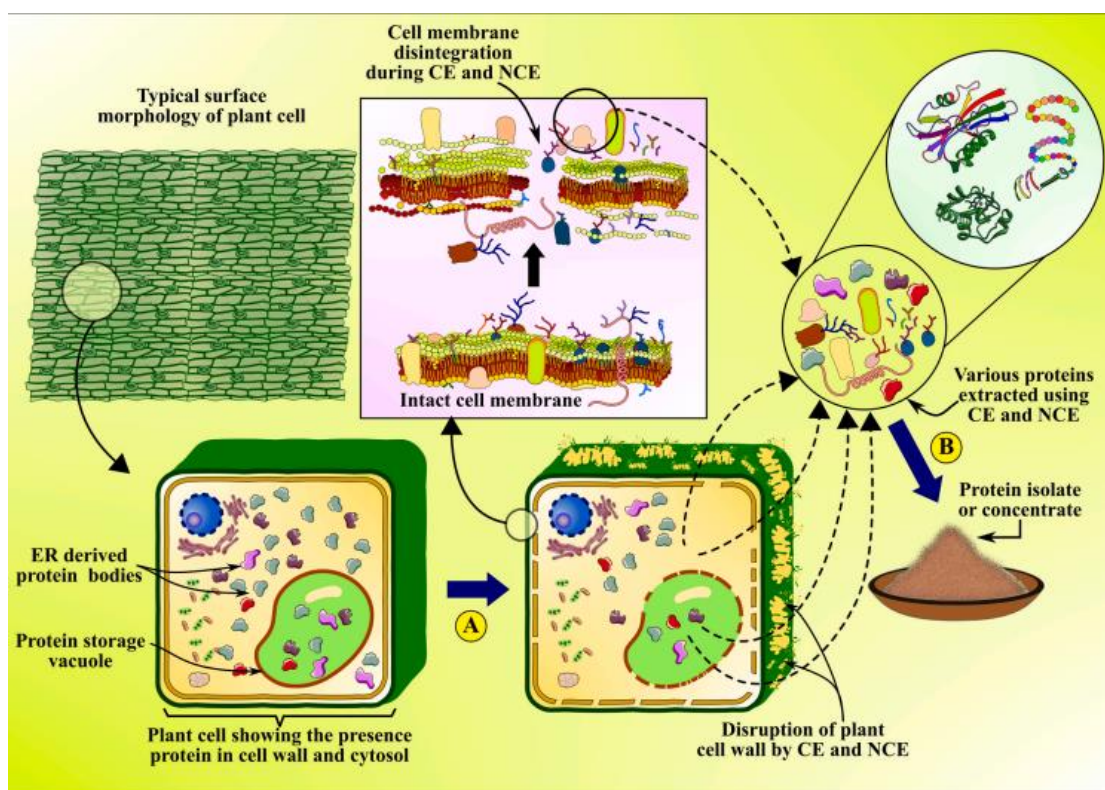
2.2.4 Εκχύλιση με υδατικά διφασικά συστήματα (Aqueous two-phase systems extraction (ATPSs))

Τα υδατικά διφασικά συστήματα (Aqueous two-phase systems extraction (ATPSs)) αποτελούν μια καινοτόμο τεχνική εκχύλισης πρωτεϊνών. Η ανάμιξη από δυο πολυμερή, ένα πολυμερές και ένα άλας, ή δυο άλατα κάτω από κατάλληλες συνθήκες (συγκέντρωση και θερμοκρασία) αποτελεί το σχηματισμό του υδατικού διφασικού συστήματος. Πρωταρχικό παράδειγμα με 99,6% αποτελεσματικότητα κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες ,χωρίς παρατήρηση μετουσίωσης της πρωτεΐνης, αποτελεί το υδατικό διφασικό σύστημα με βάση το ιοντικό υγρό γουανιδίνης με φωσφορικό υδρογόνο. Επιπλέον τεχνητοί ή φυσικοί διαλύτες κάνουν την εμφάνισή τους ως η νέα γενιά φιλικών προς το περιβάλλον ή αλλιώς “πράσινων” διαλυτών. Η ανάμιξη υποκατεστημένων τεταρτογενών αλάτων αμμωνίου και δοτών δεσμών υδρογόνου, όπως αμίνες ,αλκοόλες και οξέα, αποτελεί έναν “πράσινο” διαλύτη γνωστό ως βαθύς ευτηκτικός διαλύτης (DES). (Pojić et al., 2018)

Μελέτες πραγματοποιούνται συνεχώς για την εύρεση του πιο αποτελεσματικού “πράσινου” DES διαλύτη. Το 2015 οι Xu et al. μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του χλωριούχου χολίνης (ChCl) με βάση τα DES και επιλέχθηκε η ChClglycerol ως ο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης για την αλβουμίνη ορού των βοοειδών (BSA). Αποδείχθηκε από τα πειράματα τους ότι το 98,16% της BSA εκχυλίστηκε υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες στον πλούσιο σε DES φάση. Επιπλέον, επιτεύχθηκε υψηλή απόδοση εκχύλισης 94,36% όταν οι ίδιες συνθήκες εφαρμόστηκαν για την εκχύλιση της τρυψίνης. Βρέθηκε ακόμη πως η διαμόρφωση της BSA παρέμεινε αμετάβλητη κατά τη διαδικασία εκχύλισης (Xu et al., 2014).

Οι φυσικοί διαλύτες κάνουν την παρουσία τους αισθητή, από το 2013 που ανακαλύφθηκαν, πως είναι ικανοί για εκχύλιση πρωτεϊνών πρωτογενών φυτικών μεταβολιτών σε στερεά κατάσταση που αναμιγνύονται στις

απαραίτητες αναλογίες. Παρά το υψηλό ιξώδες τους συναντώνται ρευστά σε θερμοκρασία δωματίου ή και χαμηλότερης αυτής. Αυτά τα διαλύματα είναι γνωστά ως βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (NADES) τα οποία προέρχονται από συνδυασμούς διάφορων μειγμάτων κυτταρικών συστατικών (πρωτογενείς μεταβολίτες) όπως σάκχαρα, αλκοόλες, αμινοξέα, οργανικά οξέα και παράγωγα χολίνης. Η νέα αυτή φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία με το μεγάλο φάσμα πολικότητας και την υπερμοριακή δομή του, διαθέτει μεγάλη διαλυτική ικανότητα με χαρακτηριστικό παράδειγμα πως τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες κ.α.) σε αυτά (NADES) είναι διαλυτά (Dai et al., 2013; Pojić et al., 2018).



Εικόνα 2.2 : A) Διάσπαση κυτάρων για την εξαγωγή πρωτεϊνών με τη χρήση συμβατικών και μη τεχνικών εκχύλισης B) Απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών συστατικών στο μέσο εκχύλισης.

Πηγή:(Kumar et al., 2021)

2.3 Μη συμβατική μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα (Non-conventional proteins extraction method) (Enzyme-assisted extraction of proteins (EAE))

Η εφαρμογή της εκχύλισης πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα (Enzyme-assisted extraction of proteins (EAE)) αποτελεί αξιοσημείωτη κατηγορία τεχνικής εκχύλισης. Μια βιοχημική (μη συμβατική) μέθοδος για πηγές πρωτεΐνης από φύκια, μύκητες και φυτά με σκοπό την ανάκτηση πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας. Η διαδικασία επικεντρώνεται στη διάσπαση του άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος με σκοπό την εξαγωγή των πρωτεϊνών. Η διάσπαση αυτή λαμβάνει χώρα λόγω της ενζυματικής αποδόμησης που προκαλούν ειδικά ένζυμα στις ημικυτταρίνες, τις κυτταρίνες και/ή την πηκτίνη, δηλαδή τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και των ινών. Εξαγωγή πρωτεϊνικών σωμάτων από τα κύτταρα των σπόρων των οσπρίων, των ελαιούχων οσπρίων και των δημητριακών στις φυτικές πηγές παρατηρείται κατά την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος με τη συμβολή πηκτινάσων και υδατανθράσων. Γνωστά παραδείγματα αποτελούν ακόμα οι εκχυλίσσεις πρωτεϊνών από φύλλα τσαγιού και Leguminosae κόμμεων ενώ κάποια αναφέρονται στον πίνακα 2.2 (Bilek, 2018; Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση ενζύμων είναι μια διαδικασία με χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον σε σύγκριση με τη χρήση χημικών ουσιών που εμφανίζεται σε άλλες μεθόδους και πιο ήπια σε σύγκριση με όξινες εκχυλίσσεις. Χρειάζεται βέβαια ένα εύρος όξινων και αλκαλικών συνθηκών για τη μέγιστη απόδοσή της. Ώρα μηδέν χαρακτηρίζεται η στιγμή κατά την οποία προστίθεται το ένζυμο για να αντιδράσει στο δείγμα και ορίζεται σε υγρές συνθήκες ως όγκος ενζύμου ανά βάρος πρωτεΐνης (v/w) ενώ σε στερεά ένζυμα ως το βάρος του ενζύμου ανά βάρος πρωτεΐνης (w/w). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH για τη βέλτιστη απόδοση πραγματοποιείται κι η διάσπαση του τοιχώματος των πρωτεϊνών στόχων. Η κύρια βοήθεια για τη διεκπεραίωση του προαναφερθέντος στόχου είναι η παρουσία των πρωτεασών (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Sari et al., 2013). Για παράδειγμα, το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας ενός συγκεκριμένου ενζύμου αυξάνει τις

αλληλεπιδράσεις μικροφυκών και ενζύμου, ενώ τιμές εκτός του εύρους μπορεί να προκαλέσουν μετουσίωση (Timira et al., 2021).

Η εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα παρέχει προϊόντα ποιοτικά και καταλληλότερα για κατανάλωση. Πέρα από τα μεμονωμένα ένζυμα χρησιμοποιούνται και συμπλέγματα ενζύμων όπως σημειώνεται στην απομόνωση πρωτεϊνών από το πίτυρο ρυζιού στο οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός διάφορων πρωτεασών (παπαΐνη) και υδατανθρασών (κυτταρινάση, πηκτινάση, αραβινόζη, β-γλυκανάση, ξυλανάση, ημικυτταρινάση). Οι πρωτεάσες έχει βρεθεί ότι δίνουν υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης. Ο συνδυασμός των μεθόδων αυτών με μηχανική επεξεργασία φαίνεται να ενισχύει την αποδοτικότητα και τη ποιότητα του τελικού προϊόντος. Παραδείγματα της μηχανικής επεξεργασίας είναι ο ηχητικός καθαρισμός, οι υπερήχοι, τα μικροκύματα (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

Οι πρωτεάσες αυξάνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών και ταυτόχρονα εμφανίζουν την υψηλότερη απόδοση κατά την εκχύλιση σε βέλτιστες αλκαλικές συνθήκες με εύρος θερμοκρασίας 45-60°C και pH 8-10, χωρίς την παρουσία μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Σε σύγκριση που έγινε μεταξύ των Protex 5L, Protex P και Protex 40XL, τα οποία λειτούργησαν κάτω από αλκαλικές συνθήκες, έναντι των Protex 26L και Protex 50FP, στα οποία υπήρχαν όξινες συνθήκες, βρέθηκε πως τα πρώτα είχαν μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης και σημειώθηκε σχεδόν ολοκληρωτική εκχύλιση της πρωτεΐνης της βιομάζας 3 ώρες μετά την επώαση αυτών. Η τυπική δόση πρωτεάσης θεωρείται το 1-5% g ή ml ενζύμου/g υποστρώματος που αποτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων από ελεύθερες πρωτεΐνες και κυτταρικών ουσιών όπως οι υδατάνθρακες. Προσοχή δίνεται ακόμη στον εκτενή χρόνο επώασής τους εξαιτίας της πιθανότητας εύρεσης μικροβίων ή της αύξησης του κόστους επεξεργασίας του τροφίμου (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Sari et al., 2013).

Στην αγορά συναντάται ποικιλία ενζύμων και υπάρχουν πολλά παραδείγματα της χρήσης τους. Σε έρευνες του πολυσακχαρίτη από τη ρίζα του *Astragalus membranaceus* βρέθηκε πως μεταξύ 8 ενζύμων η οξειδάση της γλυκόζης είχε τη καλύτερη απόδοση ενώ σε σύγκριση με μη ενζυμική μέθοδο σημείωσε

ποσοστό ανάκτησης σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της μεθόδου χωρίς ένζυμα. Η κυτταρινάση, σε συνδυασμό με ιοντικά υγρά, βελτίωσε σημαντικά την απόδοση εκχύλισης των χλωρογενικού οξέος από την *Eucommia ulmoides* και διαπιστώθηκε ότι στα απόβλητα τομάτας με τη χρήση αυτής και της πηκτινάσης, είχαν αυξηθεί τα καροτενοειδή και το λυκοπένιο (Zhang et al., 2018).

Αξιοσημείωτο παράδειγμα της υποβοηθούμενης από ένζυμα εκχύλισης είναι η χρήση των ενζύμων σε ελαιόπιτα από ελαιοκράμβη. Για την εξέταση της απόδοσης των ενζύμων και της αποδοτικότητας τους σε αυτά το 2014 σε μια μελέτη των Rommi et al. έγινε χρήση παρασκευασμάτων ενζύμων αποικοδόμησης κυτταρικού τοιχώματος και πηκτίνης με σκοπό την ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης των πρωτεϊνών από πίτα ελαιοτριβείου ελαιοκράμβης. Χρησιμοποιήθηκαν πίτες ελαιοκράμβης από ψυχρή έκθλιψη άθικτων σπόρων *Brassica rapa* και μερικώς αποφλοιωμένων σπόρων *Brassica napus*. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με πηκτινολυτικά (Pectinex Ultra SP-L), κυτταρινολυτικά (Celluclast 1.5L) και ξυνανολυτικά (Depol 740L) ενζυμικά παρασκευάσματα στην ψυχρή επεξεργασία λαδιού. Από την έρευνα αυτή βρέθηκε ότι η απόδοση της εκχύλισης της πρωτεΐνης σε σύγκριση με μη ενζυμική επεξεργασία αυξήθηκε σε 1,7 φορές. Τα πηκτινολυτικά παρασκευάσματα αποσύνθεσαν αποτελεσματικά τα κυτταρικά τοιχώματα των εμβρύων μέσω της υδρόλυσης των πηκτικών πολυσακχαριτών και των γλυκανών. Μετά την αποσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων το αρχικό ποσοστό πρωτεΐνης 36-40% ανέρχεται σε 56% ή 74% ανάλογα με το τύπου του κέικ πρέσας. (Rommi et al., 2014)

Επόμενη μελέτη των Rommi et al. το 2015 εξέτασε την επίδραση του pH στην διαδικασία της ανάκτησης πρωτεϊνών από την ψυχρή έκθλιψη απολιπασμένης ελαιοκράμβης (*Brassica rapa*). Αυτό πραγματοποιήθηκε σε αραιή ενζυματική υδατική εκχύλιση (συνθήκες αφυδατωμένου νερού) με χρήση πηκτινάσης, ενδο-β-γλυκανάσης και κυτταρινάσης χωρίς ρύθμιση του pH σε σύγκριση με τις συνήθεις διαδικασίες ανάκτησης (αλκαλική εκχύλιση και ισοηλεκτρική καθίζηση). Σε τιμές pH=6 οι πρωτεΐνες από την ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων χαρακτηρίστηκαν από σταθερότητα διασποράς και υψηλό βαθμό διαλυτότητας σε σύγκριση με εκείνες από τη συνήθης

διαδικασία ανάκτησης (ισοηλεκτρική καθίζηση σε αλκαλικό pH). Η ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων έδωσε υψηλό ποσοστό περιεκτικότητας σε στερεά 40% ενώ η μη ενζυμική αλκαλική εκχύλιση με pH=10 σημειώνει ποσοστό 10% περιεκτικότητα σε στερεά. Συμπέρασμα ,πως η πρωτεΐνη της ελαιοκράμβης έχει τη δυνατότητα εκχύλισης καθιστώντας μη απαιτούμενη την έκθεσή της σε αλκάλια (Rommi et al., 2015).

Έχει αποδειχθεί ακόμη πως η απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών για τα άλευρα σόγιας με τη χρήση σερίνης, ενδο- και εξωπρωτεασών αυξάνεται έναντι αυτής όταν δεν γίνεται χρήση ενζύμων. Τα ποσοστά είναι αντίστοιχα 90% έναντι του 80% (Pojic et al., 2018). Αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης κατά 21% έπειτα από ενζυμική επεξεργασία με χρήση ξυναλάσης, πηκτινάσης, κυτταρινάσης και ένα σύμπλεγμα ενζύμων (NS22119) έναντι αλκαλικής εκχύλισης 2 ωρών σημειώθηκε στο απολιπασμένο άλευρο σόγιας. Επίσης από την 3ωρη αλκαλική εκχύλιση μεγαλύτερα ποσοστά (κατά 13%) εμφανίστηκαν στο συνδυασμό χρήσης ενζύμων (πηκτινάση, ξυναλάση, κυτταρινάση) και επακόλουθη 2ωρη αλκαλική εκχύλιση (Kumar et al., 2021).

Υπάρχουν περιπτώσεις που η απλή χρήση ενζύμων δεν συμβάλλει στην απομόνωση των πρωτεϊνών στόχων από κάθε τρόφιμο. Η πολυπλοκότητα του υποστρώματος σε κάποια προϊόντα όπως τα φύκια (κόκκινα φύκια *Chondracanthus chamissoi* και καφέ φύκια *Macrocystis pyrifera*) εμποδίζει την εκχύλιση. Τη λύση σε αυτή τη δυσκολία δίνει η βιομηχανική εκχύλιση ενός ή περισσότερων ενζύμων. Προτιμώνται ένζυμα που βοηθούν στην αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος όπως η κυτταρινάση και η αλκαλάση. Οι πρωτεΐνες που εκχυλίζονται μετά από τις βιομηχανικές διαδικασίες χαρακτηρίζονται από υψηλή θερμική σταθερότητα, χαμηλό ιξώδες και χαμηλή ανθεκτικότητα σε οξειδώσεις. Η μέθοδος προτιμάται με σκοπό τη δημιουργία βελτιωμένων λειτουργικών προϊόντων και την ενσωμάτωση νέων ιδιοτήτων για ανώτερα ποιοτικά τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση. Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται εμφανίζουν αφριστικές, γαλακτωματοποιητικές αλλά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων με καινοτόμες φυσικές διαδικασίες εκχύλισης όπως μικροκύματα, υπέρηχοι ή υψηλή πίεση για τη βέλτιστη εκχύλιση πρωτεϊνών από φυσικές μήτρες έχει κερδοφόρα αποτελέσματα (Kumar et al., 2021). Η διάσπαση των κυττάρων

των φυκών βέβαια απαιτεί την εφαρμογή περισσότερων από ένα ένζυμο λόγω της πολυπλοκότητας του κυτταρικού τοιχώματος άρα αυξάνεται και ένα μέρος του κόστους (Timira et al., 2021).

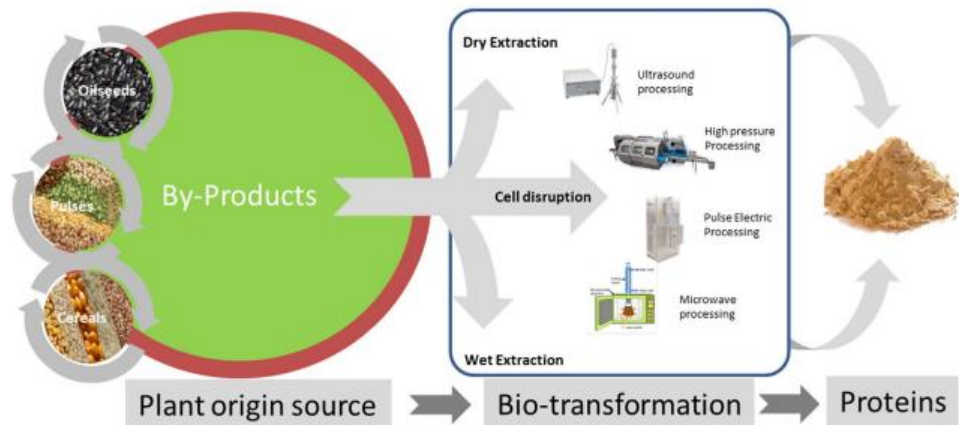
Πίνακας 2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα (ενός ή πολλαπλών) σε φυτικές πηγές.

Εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη από ένζυμα (EAE) με τη χρήση ενός μόνο ενζύμου			
ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΕΝΖΥΜΟ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Λιναρόσπορος	Κυτταρινάση	pH:5 Ενζυμική δραστηριότητα: 0.8 Units.mg ⁻¹ Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 2% (w/w) Επώαση:37°C Χρόνος:4h	Απόδοση πρωτεΐνης με τη βοήθεια ενζύμου-διαλύτη - 86,80% και ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση - 65,08%
Γεύματα με σόγια	Πρωτεάση M	pH:4,5 Ενζυμική δραστηριότητα: 51.5 AU/g Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 4% (w/w) Επώαση:50°C	Υποκρίσιμο νερό με τη βοήθεια ενζυμικής εκχύλιση αποδίδει 59,3% πρωτεΐνη
Κόκκινο φασόλι	Protex 6 L	pH:8,4 Ενζυμική δραστηριότητα: 3,5% Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 1:6.8 (w/v) Επώαση:56°C Χρόνος:3,5h	73,34% πρωτεΐνες που ανακτώνται από υδατική ενζυμική εκχύλιση
Τομάτα	Παπαΐνη	pH:3 Ενζυμική δραστηριότητα: 1.937 U/mg Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 67 U/g Επώαση:40°C Χρόνος:6h	>85,64% ανάκτηση πρωτεϊνών
Φύλλα ελιάς	Celluclast 1.5 L	pH:5 Ενζυμική δραστηριότητα: 1500 NCU/g	1,87-6,64 mg/g ανακτώμενης πρωτεΐνης από διαφορετικές

		Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 5% (v/v) Επώαση: 55°C Χρόνος: 15min Ακετονιτρίλιο: 30%	γενετικές ποικιλίες φύλλα ελιάς
Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (EAE) με χρήση πολλαπλών ενζύμων			
Κριθάρι	Δύο α-αμυλάσες Bacillus sp. και Termamyl™	pH: 6,5 (Bacillus sp.) Ενζυμική δραστηριότητα: 10,000 U/g Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 10:1 (w/v) Επώαση: 65°C Χρόνος: 1h pH: 6,5 (Termamyl™) Ενζυμική δραστηριότητα: 5000 U/g Επώαση: 40°C Χρόνος: 16h	53,8% πρωτεΐνες που ανακτώνται με τη χρήση μονοενζυματικής διαδικασίας (Bacillus sp.) και 46,8% με τη χρήση Termamyl™
Φιστίκι	Αλκαλάση 2,4 L, Nutrase, Protamex, κυτταρινάση	pH: 9,5 Ενζυμική δραστηριότητα: - Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 5% (w/w) Επώαση: 25-55°C Χρόνος: 8h Επώαση: 60°C Χρόνος: 90min	71,38% πρωτεΐνες που ανακτώνται από υδατική εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων
Σπόρος Moringa Oleifera	Natuzyme, Kemzyme, Protex 7 L, Multifect CX 13 L and Viscozyme L	pH: 9 Ενζυμική δραστηριότητα: - Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου: 8% (w/w) Επώαση: 45°C Χρόνος: 120min	75,4% πρωτεΐνες που ανακτώνται με υδατικό διάλυμα εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων
Σουσάμι από πίτουρο	Viscozyme L (κυτταρινάση) και Αλκαλάση (πρωτεάση)	pH: 2,5-6 (Viscozyme L) Ενζυμική δραστηριότητα: 6 - 120 FBG unit/100 g Επώαση: 45°C Χρόνος: 30min pH: 6-11 (Alcalase) Ενζυμική δραστηριότητα: 0.12-2.40 AU/100 g	Βισκοζύμη L - 31 έως 44,8% Αλκαλάση- 41,1 έως 77,7%

		Επώαση:45°C Χρόνος:30min	
Κέικ αμυγδάλου	FoodPro αλκαλική πρωτεάση (ενδοπρωτεάση)	pH: 8-10 Ενζυμική δραστηριότητα 580,000–650,000 DU/g Υπόστρωμα για την ανάπτυξη του ενζύμου:- Επώαση:50°C Χρόνος:1-2h	70% απόδοση πρωτεΐνης από το ένζυμο υποβοηθούμενη υδατική εκχύλιση

Πηγή: (Kumar et al., 2021)



Εικόνα 2.1 : Οικολογικές καινοτόμες τεχνολογίες για την εκχύλιση πρωτεϊνών.

Πηγή:(Pojić et al., 2018)

2.4 Φυσικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών (Physical methods for extraction of proteins)

Κατά την όποια διεργασία απομόνωσης πρωτεϊνών συναντάται η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να πραγματοποιηθεί η απελευθέρωση των πρωτεϊνών στόχων. Μετά από κατάλληλες μελέτες καινοτόμες μέθοδοι εκχυλίσεως έχουν αναπτυχθεί. Αυτές ξεχωρίζουν λόγω των πλεονεκτημάτων που έχουν σε οικονομικό και περιβαλλοντικό επίπεδο. Ο χρόνος ακόμη των διαδικασιών εκτιμάται μικρότερος σε σύγκριση με τις παραπάνω εφαρμογές. Η προτίμηση των φυσικών μεθόδων εκχύλισης προκύπτει λόγω της έλλειψης υψηλής θερμότητας ή την απουσία διαλυτών, συνθήκες στις οποίες οι πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες. Στις νέες αυτές τεχνολογίες συναντώνται η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο και με υψηλή πίεση. Αυτές οι νέες

βοηθητικές τεχνικές διάσπασης κυττάρων χαρακτηρίζονται φυσικές τεχνικές για την εκχύλιση των πρωτεϊνών (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

2.4.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-assisted extraction(MAE))

Τα μικροκύματα ορίζονται στο φάσμα μεταξύ των ακτινών Χ και των υπέρυθρων ακτινών και χαρακτηρίζονται ως μη ιοντιζουσες ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες συχνότητας 300MHz-300GHz. Τα μικροκύματα παράγουν θερμότητα μέσα από τον μηχανισμό θέρμανσης των αλληλεπιδράσεων των πολικών ενώσεων π.χ. νερό και των οργανικών συστατικών του υποστρώματος. Η παραγωγή των μικροκυμάτων βασίζεται στη δράση του μηχανισμού περιστροφής του διπόλου και της ιοντικής αγωγιμότητας. Η ενέργεια (θερμότητα) την οποία δημιουργεί η ακτινοβολία των μικροκυμάτων, μέσα από τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, θερμαίνει το διάλυμα και διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου (H) του κυτταρικού τοιχώματος του υλικού. Η διαταραχή επιτρέπει τη διείσδυση του διαλύτη στο κύτταρο με μεγαλύτερη ευκολία από πριν διότι το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος αυξήθηκε. Γίνεται η εκρόφηση των χημικών ουσιών από το προϊόν πιο εύκολη και αυξάνεται η απόδοση της μεθόδου όσον αφορά την ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών (Bilek, 2018; Gangopadhyay et al., 2015; Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-assisted extraction (MAE)) πλεονεκτεί με κύριο όφελος την αύξηση της απόδοσης της διαδικασίας. Χαρακτηρίζεται ικανή για μείωση της κατανάλωσης των διαλυτών, αποτελεσματική στη μείωση της θερμικής υποβάθμισης και στην εξοικονόμηση θερμότητας. Οι Kala & Mohan (Kala & Mohan, 2012) διεξήγαγαν μελέτη με σκοπό την ανακάλυψη του ρόλου της επεξεργασίας των μικροκυμάτων στην εξάλειψη των αντιθρεπτικών παραγόντων, όπως φυτικό οξύ, υδροκυάνιο, ολικά οξαλικά, δραστηκότητα αναστολέα της θρυψίνης, ολιγοσακχαρίτες και φυτοαιμαγλουτίνες στους σπόρους δύο διαδόχων του βελούδου φασολιού, *Mucuna pruriens var.utilis*. Αποδείχθηκε από πειράματα πως η επεξεργασία με μικροκύματα μείωσε τα θερμικά σταθερά και ασταθή αντιθρεπτικά συστατικά (Bilek, 2018; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Η πράσινη αυτή τεχνολογία, όπως χαρακτηρίζεται λόγω της μειωμένης

χρήσης των οργανικών διαλυτών που απαιτεί, επηρεάζει τη δευτεροταγή πρωτεϊνική δομή και βελτιώνει έναν αριθμό λειτουργικών ιδιοτήτων, όπως ο δείκτης απορρόφησης λίπους, ο δείκτης απορρόφησης νερού, η αφριστική δράση, η γαλακτωματοποιητική δράση και η πεπτικότητα των πρωτεϊνών *in vitro*. Παρόλα αυτά παρουσιάζεται μείωση σε ορισμένες άλλες ιδιότητες, όπως ο δείκτης διαλυτότητας του νερού, του αζώτου και η σταθερότητα του αφρού (Pojic et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Για την εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων είναι ακόμη γνωστό πως εξαρτώμενη από τις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας λαμβάνει χώρα είτε σε ανοιχτό είτε σε κλειστό σύστημα δοχείων. Το πρώτο χρησιμοποιείται για επεξεργασίες σε συνθήκες ατμοσφαιρικές ενώ το δεύτερο σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Γίνεται ένας επιπλέον διαχωρισμός δύο υποκατηγοριών για τη μέθοδο αυτή. Ο πρώτος τύπος αναφέρεται σε πτητικές ενώσεις και γίνεται εκχύλιση απουσία διαλύτη ενώ ο δεύτερος τύπος παρουσία διαλύτη χρησιμοποιείται σε μη πτητικές ενώσεις (Kumar et al., 2021; Zhang et al., 2018).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρήσης της εκχύλισης με μικροκύματα αποτελεί η εκχύλιση πρωτεϊνών από το πύρο του ρυζιού με μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Η ισχύς μικροκυμάτων κυμαίνεται 600-800W και ο χρόνος 100 s ενώ η βέλτιστη συνθήκη απαιτεί 1000 W ισχύος μικροκυμάτων, 90 s εκχύλισης και αναλογία στερεού προς υγρό 0,89 g πιτύρου ρυζιού/10 mL απεσταγμένου νερού. Βοήθεια αποτελεί ο μηχανισμός λειτουργίας της μεθόδου με αποτέλεσμα την μετακίνηση του ενδοκυτταρικού υλικού (πρωτεΐνες) στο διαλύτη έπειτα από ρήξη του φράγματος του κυτταρικού τοιχώματος που εμποδίζει τα συστατικά-στόχους. Σε σύγκριση με την απόδοση της εκχύλισης αποκλειστικά από αλκαλικούς διαλύτες η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων πλεονεκτεί κατά 1,54 φορές με τη πεπτικότητα των πρωτεϊνών να μένει παρόμοια. Βέβαια, παρόλο που οι ιδιότητες της πρωτεΐνης πιτύρου ρυζιού ελέγχονται από την ενζυμική τροποποίηση, η υπερβολική ενζυμική υδρόλυση προκαλεί αρνητικές επιδράσεις στην ικανότητα απορρόφησης νερού και ελαίου (Phongthai et al., 2016). Επιπλέον παραδείγματα δίνονται στον πίνακα 2.3 για τη χρήση της μεθόδου σε φυτικές πηγές.

Η εκχύλιση με μικροκύματα έχει διερευνηθεί και για βρώσιμα έντομα όπως ο γρύλος *Gryllodes sigillatus* για τον οποίο βρέθηκε θετική η επίδραση της μεθόδου σε συνδυασμό και με την ενζυμική υδρόλυση. Με την προσθήκη του ενζύμου της αλκαλάσης τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα από όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο η μέθοδος των μικροκυμάτων. Σε σύγκριση με την συμβατική υδρόλυση όσον αφορά τη διάσπαση των πρωτεϊνών η θέρμανση με μικροκύματα ήταν ταχύτερη με χρόνο διάσπασης $t=20$ min και $t=10$ min αντίστοιχα (Cláudia da Costa Rocha et al., 2021). Η εκχύλιση πρωτεϊνών από βιομάζα μικροφυκών όπως το *Stigeoclonium* sp. Και το *Monographidium* sp. απέδωσε έως και 193 mg/L διαλυτών πρωτεϊνών (Timira et al., 2021).

Συγκρίνοντας την υποβοηθούμενη από μικροκύματα μέθοδο εκχύλισης πρωτεϊνών με άλλες που δεν χρησιμοποιούν μικροκύματα η πρώτη πλεονεκτεί εκτός από την απόδοση, στη πεπτικότητα και στις τεχνολογικές ιδιότητες (Kumar et al., 2021).

Ένα από τα παραδείγματα των καλύτερων αποτελεσμάτων της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα αποτελούν τα απολιπασμένα φιστίκια, από τη βιομηχανία ελαιόλαδου, στα οποία μετά το πέρας πειραμάτων των Ochoa-Rivas et al. ,το 2017, βρέθηκε το ποσοστό εκχύλισης 55%, με 100% καθαρότητα ,δηλαδή 77% περισσότερη απομονωμένη πρωτεΐνη. Η ισχύς ήταν στα 725W και ο χρόνος στα 8min. Η δευτερογενής δομή των πρωτεϊνών των απολιπασμένων φιστικιών επηρεάστηκε θετικά από τη χρήση των μικροκυμάτων και βελτιώθηκαν λειτουργικές ιδιότητες όπως η απορρόφηση νερού, η δραστηριότητα αφρισμού, η γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα και η *in vitro* πεπτικότητα. Η χρήση των μικροκυμάτων συνέβαλλε ακόμη και στη παραγωγή απομονωμένων προϊόντων υψηλής καθαρότητας (Ochoa-Rivas et al., 2017).

Αύξηση κατά 58% παρατηρείται στην απόδοση της μεθόδου των μικροκυμάτων σε σύγκριση με τη μέθοδο εξαγωγής πρωτεϊνών με ζεστό νερό για τη σόγια με ισχύ 2450 MHz σε 30 min. Ακόμη με 8,3% ποσοστό αύξησης της απόδοσης σε σχέση με τη συμβατική υδατική εκχύλιση και 60 φορές λιγότερο χρόνο με ισχύ στα 900W χαρακτηρίζεται η *Opuntia ficus-indica* αν χρησιμοποιηθεί η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα (Kumar et al., 2021).

Η καινοτόμος αυτή μέθοδος απομόνωσης των πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από πολλά οφέλη όμως λόγω των υψηλών ποσοστών της θερμικής ενέργειας αποικοδομείται σημαντικό ποσοστό θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων μετατρέποντάς την σε ακατάλληλη σε ορισμένες περιπτώσεις. Φυσικά η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αλλά και ο συνδυασμός με άλλες φυσικές ή βιοχημικές (μη συμβατικές) μεθόδους μπορούν να μετατρέψουν ξανά την εκχύλιση με μικροκύματα σε επιθυμητή. Συνιστάται η επιλογή της φυσικής αυτής διεργασίας απομόνωσης σε περιπτώσεις δομικών άκαμπτων βιολογικών δειγμάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από δυσκολία αφομοίωσης από ένζυμα ή/ και κύματα υπερήχων. Μια πιθανή χρήση της διεργασίας συναντάται σε υποπροϊόντα της βιομηχανίας άλεσης όπως πίτουρο σιταριού, ρυζιού ή από σουσάμι (Kumar et al., 2021).

Πίνακας 2.3 Εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση μικροκυμάτων σε φυτικές πηγές.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Φιστίκι	Ισχύς: 725 W Χρόνος: 8 min	55% της καθαρότητας
Σόγια	Συχνότητα: 2450 MHz Χρόνος: 30 min Θερμοκρασία: 60,1°C Αναλογία νερού προς στερεό: 12,6 mL/g	Περίπου 58% αύξηση σε σύγκριση με εκχύλιση με ζεστό νερό
Πίτουρο ρυζιού	Ισχύς: 800 W Χρόνος: 40 s pH: 8,0 ακολουθούμενη από ομογενοποίηση σε 1400 RPM για 10 min	82,6%
Φραγκοσουκιά	Ισχύς: 900 W	8,3% αύξηση της απόδοσης σε σχέση με τα συμβατικά εκχύλιση με νερό με 60 φορές μείωση της χρόνο

Πηγή: (Kumar et al., 2021)

2.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-assisted extraction (UAE))

Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction (UAE)) ή αλλιώς εκχύλιση με υπερήχους, γνωστή κι ως ηχοβόλιση, χρησιμοποιεί υπερηχητικά κύματα συχνότητας 20 kHz τα οποία προκαλούν το φαινόμενο της σπηλαίωσης. Σπηλαίωση ονομάζεται το φαινόμενο ατμοποίησης ενός

υγρού δημιουργώντας φυσαλίδες εξαιτίας των δυνάμεων που ενεργούν επί του νερού. Συγκεκριμένα το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης προκύπτει όταν ένα ακουστικό πεδίο αλληλεπιδρά με φυσαλίδες μεγέθους μικρομέτρων σε υγρά. Οι φυσαλίδες σε κατάλληλο εύρος μεγέθους μπορούν να αναπνυχθούν με ένα συνδυασμό ορθολογικής ανάπτυξης διάχυσης και μονοπατιών συνένωσης φυσαλίδων σε ακουστικό πεδίο. Όταν οι φυσαλίδες φθάσουν σε κρίσιμο εύρος μεγέθους, υφίστανται απότομη ανάπτυξη που ακολουθείται από αδρανειακή κατάρρευση εντός ενός ακουστικού κύκλου. Η κατάρρευση των φυσαλίδων που εμφανίζονται από τη χρήση υπερήχων στη κυτταρική επιφάνεια του δείγματος, η μικρο-ροή και τα κρουστικά κύματα ασκούν υψηλή διατμητική και μηχανική δύναμη προκαλώντας τη κατάρρευση του τοιχώματος. Σχηματίζονται μικρο-σχισμές οι οποίες αυξάνουν το πορώδες του υποστρώματος. Από αυτές τις σχισμές ο διαλύτης της μεθόδου διεισδύει στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνει τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες-στόχους. Η κατάρρευση των φυσαλίδων έχει ως αποτέλεσμα την παροδική παραγωγή υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων στο εσωτερικό των φυσαλίδων. Η εξαγωγή των επιθυμητών συστατικών από το προϊόν γίνεται ευκολότερη με την αύξηση της διαπερατότητας λόγω της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος. Η μέθοδος συναντάται συνήθως σε διάφορους τύπους φυσικών προϊόντων και εφαρμόζεται για την απομόνωση θερμοδιαλυτών και ασταθών ενώσεων (Ashokkumar et al., 2010; Bilek, 2018; Gangopadhyay et al., 2015; Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί στην εκχύλιση με υπερήχους είναι ο κατακερματισμός, η διάβρωση, τα ηχοκαθετηριακά φαινόμενα, η ηχοαποδόμηση, η αποδιάταξη και η τοπική διατμητική τάση. Η θερμοκρασία, ο χρόνος, το pH, η συχνότητα, η ισχύς, ο λόγος και η ένταση των υπερηχητικών κυμάτων είναι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της μεθόδου. Διαφορετικοί παράγοντες φυσικά ασκούν επιρροή σε διαφορετικές παραμέτρους. Οι φυσικές παράμετροι επηρεάζονται από την ένταση, τη συχνότητα, την ισχύ, το μέγεθος και το σχήμα του αντιδραστήρα υπερήχων, ενώ οι παράμετροι του μέσου εκχύλισης επηρεάζονται από το διαλύτη, τη θερμοκρασία, το υλικό του δείγματος, τα διαλυμένα αέρια και την

εξωτερική πίεση. Η ενέργεια που απαιτείται κατά τη διεργασία εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου προϊόντος, το μοριακό του βάρος και την περιεκτικότητα του σε β-γλυκάνη. Τα κύματα υπερήχων χαμηλής έντασης χρησιμοποιούνται γενικά σε μη καταστροφικές τεχνικές, ενώ τα υψηλής έντασης κύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διάχυση και γαλακτωματοποίηση (Gangopadhyay et al., 2015; Kumar et al., 2021).

Στη βιομηχανία τροφίμων, η εφαρμογή των υπερήχων μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτές κατηγορίες, της χαμηλής έντασης-υψηλής συχνότητας ($f > 100$ kHz) και της υψηλής έντασης-χαμηλής συχνότητας (20 kHz f 100 kHz) υπερήχων (Timira et al., 2021). Έχει βρεθεί πως η χαμηλή ένταση 250-425 kJ/L συμβάλλει στη λήψη μεγάλου μοριακού βάρους β-γλυκάνης >400 kDa, αν και δεν συναντώνται ποσοστά απόδοσης της εκχύλισης υψηλότερα από 50%. Αντιθέτως, υψηλότερη απόδοση στην εκχύλιση των β-γλυκάνων υπάρχει σε επεξεργασίες υψηλής έντασης με συνήθης τη παρουσία του πολυμερισμού του επιθυμητού προϊόντος. Αποτελεσματική αποδείχθηκε η συνθήκη αυτή για τον κηρώδη γονότυπο του κριθαριού. Ένα παράδειγμα της φυσικής μεθόδου των υπερήχων αποτελεί η εκχύλιση ελαίων από σόγια. Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται χρήση εξανίου, ισοπροπανόλης και 3:2 μείγματος εξανίου-ισοπροπανόλης. Το μείγμα μαζί με τους υπερήχους που λαμβάνουν χώρα εμφανίζουν υψηλές αποδόσεις ελαίου σε σχέση με μη επεξεργασμένα δείγματα. Ο χρόνος ακόμη που απαιτούταν για την εκχύλιση βρώσιμου ελαίου μειώνεται καθιστώντας τη διαδικασία ως μια καλή επιλογή για τις απαιτήσεις της παραγωγής. Γνωστές είναι οι βελτιστοποιημένες συνθήκες για την εκχύλιση των πρωτεϊνών από την ελαιοκράμβη. Στις έρευνες που διεξάχθηκαν για αυτήν, με σκοπό την μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης της, σημειώνεται χρήση ισχύος 450 W σε 80 λεπτά βελτιστοποιημένων συνθηκών με αναλογία δείγματος προς διαλύτη 1:20. Η αύξηση της απόδοσης παρουσιάστηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας υπερήχων από 25°C σε 35°C ενώ μειώθηκε δραστικά στους 55-65°C και στο εύρος 35-55°C βρέθηκε αμετάβλητη. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες αύξησαν την απόδοση κατά την εκχύλιση πρωτεϊνών από ελαιοκράμβη σε 9,81 g/100g (Chakraborty et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Στο πίτυρο σιταριού πραγματοποιείται η εκχύλιση με υπερήχους για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων, θερμοκρασία 60°C, συγκέντρωση αιθανόλης 64% και χρόνος 25 λεπτά. Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες είναι $3,12 \pm 0,03$ mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE)/g πίτυρου η οποία προέκυψε από τη χρήση εκχύλισης με υπερήχους και αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματική με την εκχύλιση Soxhlet που απέδωσε 2,2-3,2 mg GAE/g πίτυρο. Συνίσταται η χρήση της μεθόδου των υπερήχων στην εκχύλιση πρωτεϊνών από ελαιούχους σπόρους όπως είναι ο ηλίανθος, η σόγια, η αραχίδα, σε υποπροϊόντα αυτών (πίτυρο ρυζιού, καρπούζι, κολοκυθόσπορο) και σε ρίζες του *Eurycoma longifolia* (Chakraborty et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Σε άλλες περιπτώσεις συνδυάζονται η μέθοδος με υποβοήθηση των υπερήχων με την αλκαλική επεξεργασία. Τότε σημειώνεται μείωση του δείκτη υδατοδιαλυτότητας, του δείκτη διαλυτότητας του αζώτου, της σταθερότητας στον αφρό, της γαλακτωματοποιητικής δραστηριότητας και της πεπτικότητας *in vitro*, ενώ ο δείκτης απορρόφησης νερού και η δραστηριότητα αφρού δείχνουν βελτιωμένοι σε σύγκριση με την εκχύλιση ελέγχου χωρίς τη χρήση επεξεργασίας με υπερήχους (Pojic et al., 2018).

Το 2017 οι Preece et al. ερεύνησαν την εντατικοποίηση των αποδόσεων εκχύλισης από σόγια με τη χρήση υπερήχων. Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αλεσμένου πολτού σόγια και οκάρας τα οποία επεξεργάστηκαν με υπερήχους. Απέδειξαν πως οι υπερήχοι αύξησαν την απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών ελαίου και στερεών από πολτό σόγιας κατά 10% μετά από 1 λεπτό επεξεργασίας, η οποία αποδόθηκε στη βελτιωμένη διαλυτότητα και όχι στη διάσπαση των κυττάρων. Προσδιορίστηκε επίσης η διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης πως οφείλεται για την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης ή/και της αποτελεσματικότητας του διαχωρισμού (απολίπανση της οκάρας). Η διαθεσιμότητα και ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης σημείωσαν αντίστοιχα τα ποσοστά 60% και 65%. Η διαθεσιμότητα είχε σημαντική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης και η απόδοση του διαχωρισμού επηρεάστηκε θετικά λόγω της μείωσης του χρόνου της επεξεργασίας. Η μείωση του χρόνου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας των διαλυτών πρωτεϊνών που είναι εγκλωβισμένες στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της μικρότερης ποσότητας

νερού που βρίσκεται στο ρεύμα αποβλήτων (okara). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ακόμη πως οι μη θερμικές επεξεργασίες, όπως αυτή των υπερήχων, έχουν τη δυνατότητα μεταβολής της αλλεργιογονικότητας των διαφόρων τροφίμων (Preece et al., 2017).

Σε έρευνα που διεξήχθη το 2017 από τους Choi et al. σε προνύμφες του σκώληκα του αλεύρου (*Tenebrio molitor*), ενήλικες γρύλους του αγρού (*Gryllus bimaculatus*) και κουκούλια μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*) βρέθηκε πως με το πέρας του χρόνου αυξάνεται το ποσοστό ανάκτησης πρωτεϊνών. Τα δείγματα *T. molitor* και *G. bimaculatus* είχαν αποξηρανθεί σε μικροκύματα και το δείγμα *B. mori* είχε καταψυχθεί και αποθηκεύτηκαν και τα τρία αμέσως στους -40°C μέχρι τη χρήση. Μετά την απολίπανση έγινε χρήση της μεθόδου των υπερήχων με 20 kHz και συχνότητα κύματος κάθε 3 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε διάφορες χρονικές στιγμές με μέγιστη τα 20 λεπτά. Μετά το πέρας της συνολικής διαδικασίας βρέθηκε μέγιστη απόδοση πρωτεΐνης του δείγματος των κουκουλιών μεταξοσκώληκα 94% (στα 20 λεπτά), ποσοστό κατά 76% υψηλότερο από την απόδοση του χωρίς ηχητική επεξεργασία (18% στα 0 λεπτά). Η απόδοση της πρωτεΐνης είχε αυξηθεί εκθετικά στα πρώτα 5 λεπτά (89%). Τα άλλα δυο δείγματα παρουσίασαν αύξηση μετά από 15 λεπτά κατά 28% και 34% αντίστοιχα για τον σκώληκα του αλεύρου και τον γρύλο. Η μέγιστη απόδοση για τα παραπάνω είναι 35% και 37% (Choi et al., 2017).

Η δυνατότητα εκλεκτικότητας που προσδίδει στη διαδικασία η χρήση των υπερήχων πετυχαίνει καλύτερα αποτελέσματα. Τα εκχυλίσματα του σκώληκα του αλεύρου με αιθανόλη και νερό ως διαλύτη με τη βοήθεια των υπερήχων έχουν υψηλό ποσοστό αμινοξέων σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση με αιθανόλη ή νερό. Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική τεχνολογία για την αύξηση της εκχύλισης αποδοτικότητας και για την εναλλακτική πηγή των εντόμων, με τη δυνατότητα αντικατάστασης των οργανικών διαλυτών με διαλύτες που δεν έχουν τοξικές επιδράσεις, εμπίπτοντας στην περιοχή της πράσινης εκχύλισης (Cláudia da Costa Rocha et al., 2021).

Μέσα από πειραματικές διαδικασίες βρέθηκαν σε πολλά τρόφιμα οι νέες βελτιστοποιημένες συνθήκες στις οποίες η απόδοση της εκχύλισης με

υπερήχους είναι υψηλότερη από μια συμβατική μέθοδο. Η μείωση του χρόνου εκχύλισης και επεξεργασίας, η ποσότητα της ενέργειας και των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, των λειτουργιών της μονάδας και των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα είναι μερικά από τα οφέλη που αναφέρονται στην ανασκόπηση των Chemat et al. Συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί οι απαιτούμενες βελτιωμένες συνθήκες και το αποτέλεσμα της ανάκτησης των πρωτεϊνών μετά το πέρας της εκχύλισης με υπερήχους για φυτικές πηγές που αναγράφεται στον πίνακα 2.4 (Chemat et al., 2017; Kumar et al., 2021).

Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων συνιστάται για τη πληθώρα των πλεονεκτημάτων που προσφέρει μετά το πέρας της. Ενισχύει την αποτελεσματικότητα και το ρυθμό εκχύλισης ενώ έχει τη δυνατότητα, ταυτόχρονα με την εκχύλιση, να πραγματοποιεί και ενθυλάκωση των εκχυλισμένων ενώσεων και υδροξυλίωση των πολυφαινολικών και καροτενοειδών, τα οποία ενισχύουν τη βιοδραστικότητα. Ο μειωμένος χρόνος που πλέον απαιτείται, αφού οι υπερήχοι επιταχύνουν τη διαδικασία, οι μικρότερες συγκεντρώσεις NaOH, η χαμηλή κατανάλωση διαλύτη και ενέργειας, οι χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας, το μειωμένο μέγεθος εξοπλισμού, η ταχύτερη απόκριση στον έλεγχο της διαδικασίας εκχύλισης, η ταχύτερη εκκίνηση και η αυξημένη παραγωγή είναι μερικά θετικά χαρακτηριστικά της εκχύλισης με τα υπερηχητικά κύματα. Συγκεκριμένα ο χρόνος μειώθηκε από 60 λεπτά (κλασσική εκχύλιση) σε 5 λεπτά και η μείωση της κατανάλωσης υδροξειδίου του νατρίου καθιστά τη μέθοδο επιτρεπτή για εφαρμογή στα καλλυντικά, τη φαρμακευτική και τη βιομηχανία τροφίμων. Ως αποτέλεσμα των πλεονεκτημάτων της μεθόδου βελτιώνονται οι λειτουργικές ιδιότητες και μειώνεται η υποβάθμιση ή η μετουσίωση των πρωτεϊνών που ανακτώνται μετά την εκχύλιση. Η μέθοδος επομένως προτείνεται σε περιπτώσεις υψηλών αποδόσεων θερμοεπιθετικών πρωτεϊνών (Chakraborty et al., 2019; Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

Παρόλα αυτά, η συνεχής υψηλή ισχύ του ηχοβολισμού έχει τη δυνατότητα να επιφέρει μείωση στην αποδοτικότητα των εκχυλισμένων πρωτεϊνών εξαρτώμενη από την εναλλακτική πηγή. Τα υπερηχητικά κύματα παράγουν ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου προωθώντας τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών

λόγω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κατάλοιπων κυστεΐνης. Μειονέκτημα άξιο αναφοράς εμφανίζεται μετά την ακουστική διέγερση που προκαλείται από τη σπηλαιώση κατά την επεξεργασία με τη βοήθεια υπερήχων. Σε αυτό εμφανίζονται μετουσιωμένα διαλυτικά πρωτεϊνικά κλάσματα τα οποία μειώνουν τα ποσοστά απόδοσης της μεθόδου. Τη λύση για αυτό το πρόβλημα δίνουν οι βελτιστοποιήσεις. Οι αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες ακόμη εμφανίζονται με χαρακτηριστικές τη μείωση της ικανότητας γαλακτωματοποίησης και αφρισμού ενώ είναι δυνατή η τροποποίηση των αμινοξέων με σουλφυδρυλικά και φαινολικά κατάλοιπα με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών (Chakraborty et al., 2019; Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018).

Το 2017 στην Κίνα διεξήχθη έρευνα τις πρωτεΐνες των απολιπασμένων φύτρων σιταριού στην οποία εξετάστηκαν οι επιδράσεις της συχνότητας των υπερήχων, της χαμηλής πυκνότητας ισχύος, της ανασταλτικής δράσης του ενζύμου της αγγειοτενσίνης I (ACE) και του χρόνου προεπεξεργασίας. Βρέθηκε πως η προεργασία με υπερήχους δεν αύξησε σημαντικά το βαθμό υδρόλυσης της απολιπασμένης πρωτεΐνης φύτρου σίτου και αποδείχθηκε πως έγιναν αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης που επηρέασαν τα υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων της ανακτημένης πρωτεΐνης (Yang et al., 2017).

Στην περίπτωση των μικροοργανισμών συναντάται η υπερηχητική επεξεργασία με στόχο την αρπαγή των μικροφυκών από τα κύτταρα. Σε μελέτες που έγιναν από τους (Safi et al., 2017) γίνεται αναφορά στις αποδόσεις πρωτεϊνών που κυμαίνονται από 8-67% των διάφορων στελεχών μικροφυκών από την επεξεργασία επακολουθούμενης με κατανάλωση ενέργειας 187kWh/kg. Οι Mahali & Sibi (2019) δημοσίευσαν στα αποτελέσματα της έρευνας τους πως οι λειτουργικές ιδιότητες των απομονωμένων πρωτεϊνών από διαφορετικά pH είχαν υψηλή απόδοση ποσοστού 84% στην A.plantesis. Η υψηλότερη διαλυτότητα της εκχυλισμένης πρωτεΐνης ήταν 73,68% σε pH 9,0 και η χαμηλότερη διαλυτότητα της πρωτεΐνης 0,27% σε pH 5,0. Η τεχνική βελτιώνει επίσης τα προϊόντα ανάκτησης από είδη όπως η Chlorella, το Scenedesmus, Neochloris oleoabundans και Nannochloropsis (Timira et al., 2021).

Πίνακας 2.4 Εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση υπερήχων σε φυτικές πηγές.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Σπιρουλίνα	θερμοκρασία:24°C πίεση:2 bar χρόνος:15 s ένταση υπερήχων:55 W/cm ² Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 1:20 g/g	συμβατική μέθοδο : 8,63% μέθοδος υπερήχων:28,42%
Σουσάμι	θερμοκρασία:45°C χρόνος:98 min συχνότητα:35 kHz ισχύς:836 W pH:9,5 Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 1:10 w/v	μέθοδος υπερήχων:59,8% με καλή περιεκτικότητα σε φαινόλες και αντιοξειδωτική δράση
Ηλίανθος	θερμοκρασία:45°C χρόνος:15 min ισχύς:220 W pH:8 Αναλογία δείγματος προς διαλύτη : 0,5:10 w/v	μέθοδος υπερήχων: 54,26% με βελτίωση των φυσικοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων
Πίτουρο Ρυζιού	θερμοκρασία:40°C χρόνος:2 min συχνότητα:20 kHz pH: 7 Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 1:10 w/v	υψηλότερη απόδοση πρωτεΐνης κατά 64,5% από τη συμβατική μέθοδο
Καρπούζι	θερμοκρασία:30°C χρόνος:9 min συχνότητα:25 kHz pH: 9 ισχύς:90 W κύκλος λειτουργίας: 75% Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 1:50 w/v	μέθοδος υπερήχων :87% με ενίσχυση των λειτουργικών ιδιοτήτων
Ελαιοκράμβη	χρόνος:41,48 min ισχύς:40% ένταση ισχύος : 0,228 W/cm ² pH:11,71 Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 1:30 w/v	υψηλότερη απόδοση πρωτεΐνης κατά 38.09% από τη συμβατική μέθοδο
Κουνουπίδι	χρόνος:15 min ισχύς:175 pH:11 Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 4mL/g	μέθοδος υπερήχων:53,07% και στη συνέχεια υδρολύεται για εφαρμογή στα τρόφιμα δραστικότητες και εφαρμογές στα τρόφιμα
Σπόροι δαμάσκηνου	χρόνος:1 min pH: 7,5 πλάτος: 30% Αναλογία δείγματος προς διαλύτη: 30 mg/5mL	υψηλότερη απόδοση πρωτεΐνης κατά 38,6% από τη συμβατική μέθοδο

Πηγή: (Kumar et al., 2021)

2.4.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed electric field (PEF)-assisted extraction)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed electric field (PEF)-assisted extraction) γίνεται με τη βοήθεια παλμικής ηλεκτρικής ενέργειας. Χρησιμοποιούνται μικρής διάρκειας ηλεκτρικοί παλμοί (από μερικά νανοδευτερόλεπτα έως αρκετά χιλιοστά του δευτερολέπτου), οι οποίοι υποβάλλονται στην εναλλακτική πηγή, υψηλού πλάτους παλμού (10-80 kV/cm) με σκοπό δομικές αλλαγές στο υλικό ώστε να ανακτηθούν οι πρωτεΐνες-στόχοι. Το δείγμα βρίσκεται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και η διαμεμβρανική τάση, που ασκείται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνει τη διαπερατότητα της τελευταίας για ιόντα και μόρια, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες, αφού είναι εκτεθειμένη σε μεγάλη ποσότητα ηλεκτρικού πεδίου. Η ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέπει τη διάχυση ενδοκυτταρικών υλικών χωρίς να επηρεάζει τη δευτερογενή δομή των πρωτεϊνών ή την αλλεργιογονικότητά τους. Το αποτέλεσμα της διαπερατότητας εξαρτάται από το πλάτος του ηλεκτρικού πεδίου, της ακτίνας του κυττάρου και της θέσης της μεμβράνης σε σχέση με το διάνυσμα της διεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου. Αν η διαπερατότητα που λαμβάνει χώρα είναι παροδική τότε το κύτταρο επιβιώνει, και αφού ανακτήσει την επιλεκτική διαπερατότητα συναντάται ένα φαινόμενο ηλεκτρομόνωσης που είναι αναστρέψιμο. Σε άλλες περιπτώσεις η ηλεκτρομόνωση είναι μη αναστρέψιμη και προκύπτει κυτταρικός θάνατος. Η ηλεκτρική παλμική ενέργεια χρησιμοποιείται σε διάφορες αγρο-διατροφικές εφαρμογές με τη μορφή διαφορετικών τύπων για την εντατικοποίηση του διαχωρισμού, της εκχύλισης, της συμπύεσης, της κατάψυξης, της διάχυσης και της ξήρανσης. Μεταξύ των διαφόρων τεχνικών της παλμικής ηλεκτρικής ενέργειας τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία, η παλμική ωμική θέρμανση και οι ηλεκτρικές εκκενώσεις υψηλής τάσης έχουν αναδειχθεί ως οι πιο ενδιαφέρουσες για εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως μη θερμική τεχνική η οποία ελαχιστοποιεί την αποικοδόμηση των θερμοευαίσθητων ενώσεων και προτιμάται για τη βελτιστοποίηση της συντήρησης των τροφίμων, τη μικροβιακή και ενζυμική αδρανοποίηση, την ενίσχυση χημικών αντιδράσεων και την εξαγωγή πρωτεϊνών από το κύτταρο. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικό

ηλεκτρικό πεδίο αυξάνει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης και μειώνει το χρόνο εκχύλισης επειδή μπορεί να αυξήσει τη μεταφορά μάζας που μεταφέρεται καταστρέφοντας τις δομές της μεμβράνης. Η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της ισχύος του πεδίου, της εισερχόμενης ενέργειας, του αριθμού παλμών και της θερμοκρασίας στην επεξεργασία. Η εκχύλιση σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπό μεγάλη διάρκεια παλμού και υψηλό ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί μεγάλη ανάκτηση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, συγκριτικά με άλλες μη συμβατικές μεθόδους είναι αναποτελεσματική για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων πρωτεϊνών. Υπάρχει ακόμη η ανάγκη για βελτιστοποίηση των παραγόντων εισόδου της εκχύλισης σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο για εκχύλιση πρωτεϊνών στην εγγενή τους κατάσταση. Πρόκειται για μια πολλά υποσχόμενη τεχνική σε σύγκριση με τις συμβατικές θερμικές επεξεργασίες, δεδομένου ότι η ποιότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται ελάχιστα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Αυτή η μέθοδος εκχύλισης δημιουργεί πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα, απελευθερώνοντας το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο ώστε να επιτρέπεται καταλλήλως η χρήση του σε μικροοργανισμούς (μικροφύκη, βακτήρια και ζύμες). Με ελάχιστη υποβάθμιση της αισθητηριακής και θρεπτικής ποιότητας χρησιμοποιούνται για τους μικροοργανισμούς ηλεκτρικοί παλμοί υψηλής τάσης στο εύρος 20 kV/cm και 80 kV/cm με στόχο την πρόκληση διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Ενισχύει την διαδικασία μεταφοράς βιοσυστατικών και θρεπτικών συστατικών. Ο συνδυασμός της PEF με ήπια θέρμανση ίσως αποτελεί μονόδρομο για την αδρανοποίηση των ανθεκτικών μορφών μικροοργανισμών όπως είναι τα σπόρια και τα ένζυμα ενώ μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά εκχύλισης πρωτεϊνών από πηγές λαχανικών (Fasolin et al., 2019). Παράδειγμα χρήσης της PEF δίνεται από τους (Postma et al., 2016) οι οποίοι χρησιμοποίησαν 1,11 kWh/kg για την εξαγωγή πρωτεϊνών της *Chlorella* ενώ αργότερα βρέθηκε πως αύξηση της τάσης σε 15 kV/cm αύξησε το ποσοστό ανάκτηση πρωτεϊνών στο 15% (Timira et al., 2021).

Η εκχύλιση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως υποσχόμενη μέθοδος για την απομόνωση ανασυνδυασμένων ενζύμων από μικρόβια στην εγγενή δομική και λειτουργική τους διαμόρφωση με υψηλή ειδική δραστικότητα. Η εκχύλιση πρωτεϊνών στην καθαρή τους μορφή (χωρίς την ανάγκη καθαρισμού) από νωπή βιομάζα μπορεί να καταστήσει την τεχνική αυτή μοναδική σε σύγκριση με άλλες συμβατικές και μη συμβατικές τεχνικές. (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018)

Σπάνια θεωρείται η εύρεση βιβλιογραφικών αναφορών για τη χρήση της τεχνολογίας παλμικής ηλεκτρικής ενέργειας για την υποβοήθηση της στην εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικές πηγές. Ωστόσο έχει βρεθεί πως η εφαρμογή της ως προεπεξεργασία για την απομόνωση πρωτεϊνών από ελαιόπιτα σησαμιού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας των οργανικών διαλυτών, του χρόνου και της θερμοκρασίας. Οι πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν στους 40°C κατά τα πρώτα 20 λεπτά της διαδικασίας, υποδεικνύοντας τη σημασία αυτής της τεχνικής για βιομηχανική χρήση. (Kumar et al., 2021; Pojić et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Σε πειράματα που έγιναν βρέθηκε πως αυξάνεται το ποσοστό απόδοσης μιας κατηγορίας φυσικών προϊόντων στεροειδών γλυκοζιτών και τριτερπενικών σαπωνίνων, των γκινσενοσίδων ή παναξοσίδων. Με τη χρήση 20 kV/cm έντασης ηλεκτρικού πεδίου, συχνότητα 6000 Hz, 70% διάλυμα αιθανόλης-νερού και ταχύτητα 150 l/h μετά το πέρας της μεθόδου ανακτήθηκαν 12,69 mg/g πρωτεϊνών από τις γκινσενοσίδες, ποσοστό που αποτελεί την υψηλότερη απόδοση. Η απόδοση της μεθόδου χαρακτηρίστηκε μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που έδιναν η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων, με τη βοήθεια υπερήχων με τη χρήση διαλύτη και με υπερυψηλή πίεση. Ο απαιτούμενος χρόνος για την εκπόνηση ήταν λιγότερος από 1 δευτερόλεπτο ενώ για την εκχύλιση με τη βοήθεια υπερυψηλής πίεσης 2 λεπτά (Hou et al., 2010).

Η χρήση της παραπάνω φυσικής μεθόδου απομόνωσης συναντάται και στην επεξεργασία της βιομάζας της ελαιοκράμβης (στελέχη και φύλλα). Η υψηλή τιμή έντασης του ηλεκτρικού πεδίου 20 kV/cm ενισχύει στατιστικά την απόδοση των πρωτεϊνών έως και περίπου 80% από φύλλα ελαιοκράμβης. Αναφορές έχουν γίνει για χρήση της υποβοηθούμενης από το παλμικό

ηλεκτρικό πεδίο τεχνικής από την ενδοκυτταρική δομή των φυτών, των φυκιών και των μυκήτων. Περισσότερα παραδείγματα εκχύλισης φυτικών πρωτεϊνών και τα αποτελέσματα της ανάκτησης τους αναφέρονται στον πίνακα 2.5 (Kumar et al., 2021; Rojić et al., 2018).

Πληθώρα εργασιών τα τελευταία χρόνια έχει αποδείξει πως κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία απομονώνονται και άλλες βιοδραστικές ενώσεις όπως οι πολυφαινόλες. Συγκεκριμένο παράδειγμα αποτελεί μια μελέτη που εξέτασε τη βελτίωση της υδατικής εκχύλισης στερεών/υγρών των πολυφαινολών που περιέχονται στο φλοιό της ερυθρελάτης (*Picea abies* (L.) Karst.) με τη χρήση επεξεργασίας με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο. Η μελέτη επιβεβαίωσε τις θετικές επιδράσεις του παλμικού ηλεκτρικού πεδίου στην εκχύλιση των ενδοκυτταρικών ενώσεων με ταυτόχρονη ενίσχυση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες βρέθηκε 8 φορές μεγαλύτερη και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα 30 φορές έπειτα από την επεξεργασία σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο σε σύγκριση με μη επεξεργασμένα δείγματα (Bouras et al., 2016).

Πίνακας 2.5 Εκχύλιση πρωτεϊνών με χρήση παλμικής ηλεκτρικής ενέργειας σε φυτικές πηγές.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Φύλλο ελαιοκράμβης	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου:20 kV/cm Χρόνος επεξεργασίας:200 ms	80% απόδοση σε σύγκριση με το 10% σε μη επεξεργασμένα δείγματα
Ραπανάκι πράσινο βιομάζα (στέλεχος)	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου: 8kV/cm Χρόνος επεξεργασίας: 2 ms	0,14 g BSA/100 g DM σε σύγκριση με 0,07 g BSA/100 g DM σε μη επεξεργασμένο
Φλούδα παπάγιας	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου: 13,3 kV/cm Χρόνος επεξεργασίας: 2720s Αριθμός παλμών: 400παλμοί Θερμοκρασία:50°C pH: 7	46% αύξηση της ανάκτησης
Λευκό Μανιτάρι	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου:38,4 kV/cm Χρόνος επεξεργασίας: 272 ms Θερμοκρασία: 20°C	48,9% σε σύγκριση με 7,45% στη συμβατική εκχύλιση στους 85 °C
Μύδια	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου: 20 kV/cm	77,08% ποσοστό ανάκτησης των

	Χρόνος επεξεργασίας: 2h Αριθμός παλμών: 8παλμοί	πρωτεϊνών , 4,13 φορές υψηλότερο από το ποσοστό της συμβατικής μεθόδου με τη χρήση NaCl
Φλούδα μάνγκο	Ισχύς ηλεκτρικού πεδίου:13,3kV/cm Αριθμός παλμών:1000 παλμοί	25% υψηλότερο ποσοστό εκχύλισης από αυτό της υδατικής εκχύλισης

Πηγή:(Kumar et al., 2021)

2.4.4 Εκχύλιση με υψηλή πίεση (High pressure extraction (HPE))

Η εκχύλιση πρωτεϊνών με υψηλή πίεση (High pressure extraction (HPE)) είναι μια μη θερμική επεξεργασία η οποία έχει σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των εκχυλίσεων των γνωστών συμβατικών μεθόδων. Ακολουθείται σε αυτή η αρχή Le Chatelier, στην οποία όταν ένα σύστημα υφίστανται μια διαταραχή γίνονται οι κατάλληλες αντιδράσεις (μέσω μεταβολής όγκου, θερμοκρασίας ή συγκέντρωσης) για να αποκατασταθεί η ισορροπία. Συγκεκριμένα στη φυσική αυτή μέθοδο, γίνεται χρήση υψηλής πίεσης με στόχο τη διαταραχή του υπάρχοντος συστήματος, μέσα από τη μετάβαση της φάσης από τη μια μορφή στην άλλη, την αλλαγή στη δυναμική της αντίδρασης, την αλλαγή στη μοριακή δομή κ.α., με απόρροια τη μετακίνηση της αντίδρασης προς τη κατεύθυνση που προάγει τη μείωση του όγκου. Με τη μείωση του όγκου επέρχεται αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Η μείωση προκύπτει έπειτα από τη συνεχή διάσπαση των ιοντικών δεσμών από την υψηλή πίεση που χρησιμοποιείται, λόγω των δυνάμεων ηλεκτροσυγκράτησης που δρουν στο νερό (Khan et al., 2019).

Η εκχύλιση πραγματοποιείται κάτω από υψηλές πιέσεις, συνήθως 100-600 MPa, για γρήγορη εκχύλιση των ενώσεων, με την απαίτηση χαμηλών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών και σε χαμηλές θερμοκρασίες (συνήθως έως 60°C), με προσπάθεια να αποφευχθεί η όποια μορφή μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Θεωρείται ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας κατά τη διάρκεια του οποίου τα στερεά που βρίσκονται στο υπόστρωμα διαχέονται στο διαλύτη μέχρι να επιτευχθεί η ισορροπία (Khan et al., 2019). Η πίεση αποσυνθέτει τους ιστούς και τα κύτταρα μέσω της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος. Ενισχύεται επομένως η μεταφορά μάζας των περιβαλλόντων διαλυτών στο κυτταρικό τοίχωμα και βελτιώνεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των πρωτεϊνών (Kumar et al., 2021).

Αναλυτικά, η διαδικασία χωρίζεται σε τρία στάδια. Αρχικά, το προϊόν αναμιγνύεται με το μέσο εκχύλισης και τοποθετείται μέσα στο δοχείο πίεσης. Η πίεση αυξάνεται, για μικρό χρονικό διάστημα, στο απαιτούμενο επίπεδο (συνήθως από 100 έως 1000 MPa). Με την αύξηση της πίεσης, η διαφορική πίεση μεταξύ του εσωτερικού των κυττάρων και του περιβάλλοντος αυξάνεται με αποτέλεσμα να παραμορφώνονται τα κύτταρα και να προκαλείται βλάβη στα κυτταρικά τοιχώματα. Ο διαλύτης διεισδύει μέσω του κατεστραμμένου κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης στο κύτταρο, αυξάνοντας τη μεταφορά μάζας των διαλυτών ενώσεων. Αλλαγές στους συντελεστές διάχυσης, στις κλίσεις συγκέντρωσης, ή του οριακού στρώματος μπορούν να διευκολύνουν τη μεταφορά μάζας των διαλυτών ενώσεων. Ως αποτέλεσμα της μεταφοράς περισσότερης μάζας αυξάνεται η διαπερατότητα και κατά συνέπεια και η απόδοση της μεθόδου. Εάν η δύναμη συμπίεσης δεν υπερβεί το όριο παραμόρφωσης των κυττάρων, ο διαλύτης διαπερνά τα κυτταρικά τοιχώματα υπό πίεση και γεμίζει το κύτταρο γρήγορα. Τα βιοδραστικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες, διαλύονται εν συνεχεία απευθείας στον διαλύτη. Εάν η συμπίεση του προϊόντος υπερβεί το όριο παραμόρφωσης των κυττάρων, το κυτταρικό τοίχωμα σπάει, τα ενεργά συστατικά ρέουν έξω από το κύτταρο και διαλύονται στο διαλύτη (Kumar et al., 2021).

Στο δεύτερο στάδιο γίνεται διατήρηση της πίεσης για ένα χρονικό διάστημα ώστε να εξισορροπηθεί η τιμή της εντός και εκτός του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια αυτή συνεχίζεται η διείσδυση του διαλύτη από το κυτταρικό τοίχωμα στο κύτταρο και η διάλυση των συστατικών του. Αν παραταθεί το στάδιο αυτό πραγματοποιείται αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης (Kumar et al., 2021).

Στο τελευταίο στάδιο, η τιμή της πίεσης του κυττάρου μειώνεται και γίνεται ίδια με την ατμοσφαιρική. Το αποτέλεσμα της αλλαγής είναι η παραμόρφωση του κυττάρου λόγω της εκτεταμένης διαστολής του. Η σύντομη ελάττωση της πίεσης θα δημιουργήσει περισσότερους πόρους στα κύτταρα οι οποίοι θα αυξήσουν την απόδοση της διαδικασίας λόγω της αύξησης της επιφάνειας της πρώτης ύλης και της διάχυσης των δραστικών ενώσεων (Kumar et al., 2021).

Η εκχύλιση κάτω από συνθήκες υψηλής πίεσης είναι μια μη θερμική τεχνική, φιλική προς το περιβάλλον, με πολλά πλεονεκτήματα. Η απουσία θερμικής

επεξεργασίας δίνει τη δυνατότητα της ένταξής της στο τομέα των τροφίμων εδραιώνοντας ταυτόχρονα ασφαλή και γευστικά τρόφιμα. Σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους αναφέρεται μικρός αριθμός προσμίξεων στο τελικό προϊόν και η θερμική υποβάθμιση σημειώνει τιμές σε χαμηλά επίπεδα. Ο μειωμένος χρόνος επεξεργασίας, η χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας, τα υψηλά ποσοστά απόδοσης είναι προτερήματα της μεθόδου σε σύγκριση με τις κλασσικές που χρησιμοποιούνταν (Khan et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Διάφορες παράμετροι επηρεάζουν τις ανακτήσεις της εκχύλισης, άρα και τη μέθοδο αυτή. Ο τύπος και η ποσότητα του διαλύτη, η φύση και η συγκέντρωσή του, η θερμοκρασία, η πίεση, ο χρόνος εκχύλισης, ο αριθμός των κύκλων και η αναλογία στερεού-υγρού είναι μερικές από αυτές. Ειδικά η πίεση καθορίζει τη διαλυτότητα των βιοδραστικών συστατικών. Όσο αυξάνεται η πίεση, αυξάνεται και η απόδοση της εκχύλισης. Αυτό συμβαίνει λόγω της αύξησης της διαλυτότητας των βιοδραστικών συστατικών από τις υψηλές τιμές της πίεσης που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, αύξηση της πίεσης συνεπάγεται ενίσχυση της διαλυτότητας των ενώσεων με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας. Η υψηλή κλίση πίεσης, προερχόμενη από υψηλή περιβαλλοντική πίεση εξωτερικά των κυττάρων, αυξάνει το ρυθμό διάλυσης της διαλυμένης ουσίας καθώς ο διαλύτης διαπερνά ταχύτατα μέσω των ιστών στο εσωτερικό των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτού είναι η θεώρηση της εκχύλισης με υψηλή πίεση ως ταχύτερη από άλλες μεθόδους εκχύλισης (Khan et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Η υψηλή πίεση μπορεί να εφαρμοστεί για την αδρανοποίηση μικροβίων και ενζύμων και την τροποποίηση της κυτταρικής δομής χωρίς να αλλοιώνεται η αισθητηριακή ποιότητα του τροφίμου (Kumar et al., 2021). Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και για τη ρήξη των μικροφυκών (Timira et al., 2021). Οι (Grimi et al., 2014) ανέφεραν τα υψηλά επίπεδα διαλυτοποίησης πρωτεϊνών που βρέθηκαν από τα είδη *C.vulgaris*, *H.pluvialis* και *N.gaditana*. Επιπλέον, βρέθηκε πως η απελευθέρωση πρωτεϊνών σε ίδια έντασης επεξεργασία λιγότερο άκαμπτων κυτταρικών τοιχωμάτων μικροφυκών (*A.platensis* και *P.cruentum*) ήταν 57% σε σύγκριση με πιο άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα (*C.vulgaris* και *N.oculata*) που απελευθέρωσαν 10% λιγότερη πρωτεΐνη (Timira et al., 2021).

Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων και βιομορίων από φυτά και βότανα. Ο συνδυασμός της ακόμη με ενζυμική επεξεργασία, επεξεργασία με μικροκύματα ή υπερήχους μπορεί να βελτιώσει την ανάκτηση φυτικών πρωτεϊνών. Μάλιστα έχει αποδειχθεί πως η υψηλή πίεση από μόνη της δεν έχει την ικανότητα να ανακτήσει μεγάλα ποσοστά πρωτεϊνών κατά την εκχύλιση, ωστόσο ο συνδυασμός της με άλλες κατάλληλες τεχνικές έχει επιτυχή αποτελέσματα. Για παράδειγμα, το τελικό ποσοστό ανάκτησης πρωτεϊνών της εκχύλισης υψηλής πίεσης σε συνδυασμό με την υποβοήθεια μικροκυμάτων ανέρχεται στο 66,3% (Kumar et al., 2021).

Παραδείγματα χρήσης της εκχύλισης με υψηλή πίεση σε φυτικές πηγές συναντώνται στον πίνακα 2.6. Η εκχύλιση από πίτυρο ρυζιού έχει μεγαλύτερη απόδοση σε υψηλότερες πιέσεις (600-800 MPa) σε σύγκριση με τα αποτελέσματά που φέρει σε χαμηλότερες τιμές (200 MPa). Η εκχύλιση με υψηλή πίεση έχει εφαρμοσθεί για την ανάκτηση διάφορων ενώσεων, όπως οι πολυσακχαρίτες από την ρίζωμα του *Ligusticum*, τις ανθοκυανίνες από το black chokeberry, τις γκινσενοσίδες από τη σκόνη του ginseng, τη ρουτίνη από το *Amaranthus* φύλλα, φλαβονοειδή και φαινολικές ενώσεις από εκχυλίσματα φύλλων καμέλιας, από φλούδα ροδιού, κοριλαγκίνη από το περικάρπιο του καρπού longan, και διάφορα άλλα βιοδραστικά υλικά από διάφορα μέρη φυτών, όπως η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων του πράσινου τσαγιού και καφεΐνης, φλαβονοειδών από πρόπολη και ξανθοχουμόλη από το λυκίσκο, ανθοκυανίνων από διάφορες φυτικές μήτρες όπως Black Catnip (*Phyllanthus amarus*) εκχυλίσματα, εκχυλίσματα ρυζιού, καρποί βραζιλιάνικου πιπεριού (*Schinus terebinthifolis*) και υπολείμματα καρπών juçara (Khan et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Πίνακας 2.6 Εκχύλιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια υψηλής πίεσης σε φυτικές πηγές.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Γύρη	Υψηλή πίεση: 330 MPa Χρόνος: 10 min	12 φορές υψηλότερη ανάκτηση από τη συμβατική μέθοδο
Πίτυρο ρυζιού	Υψηλή πίεση: 500 MPa Χρόνος: 5 min Θερμοκρασία: 25°C	66,3%

	ακολουθούμενη από επεξεργασία με άμυλα σε πρωτεάση	
Νιφάδες σόγιας	Υψηλή πίεση: 200 MPa Χρόνος: 15 min Θερμοκρασία: 25°C ακολουθούμενη από υδατική εκχύλιση	10,9% αύξηση σε σχέση με την υδατική εκχύλιση
Ρύζι	Υψηλή πίεση: 300 MPa Χρόνος: 30 min	0.4 mg/g

Πηγή:(Kumar et al., 2021)

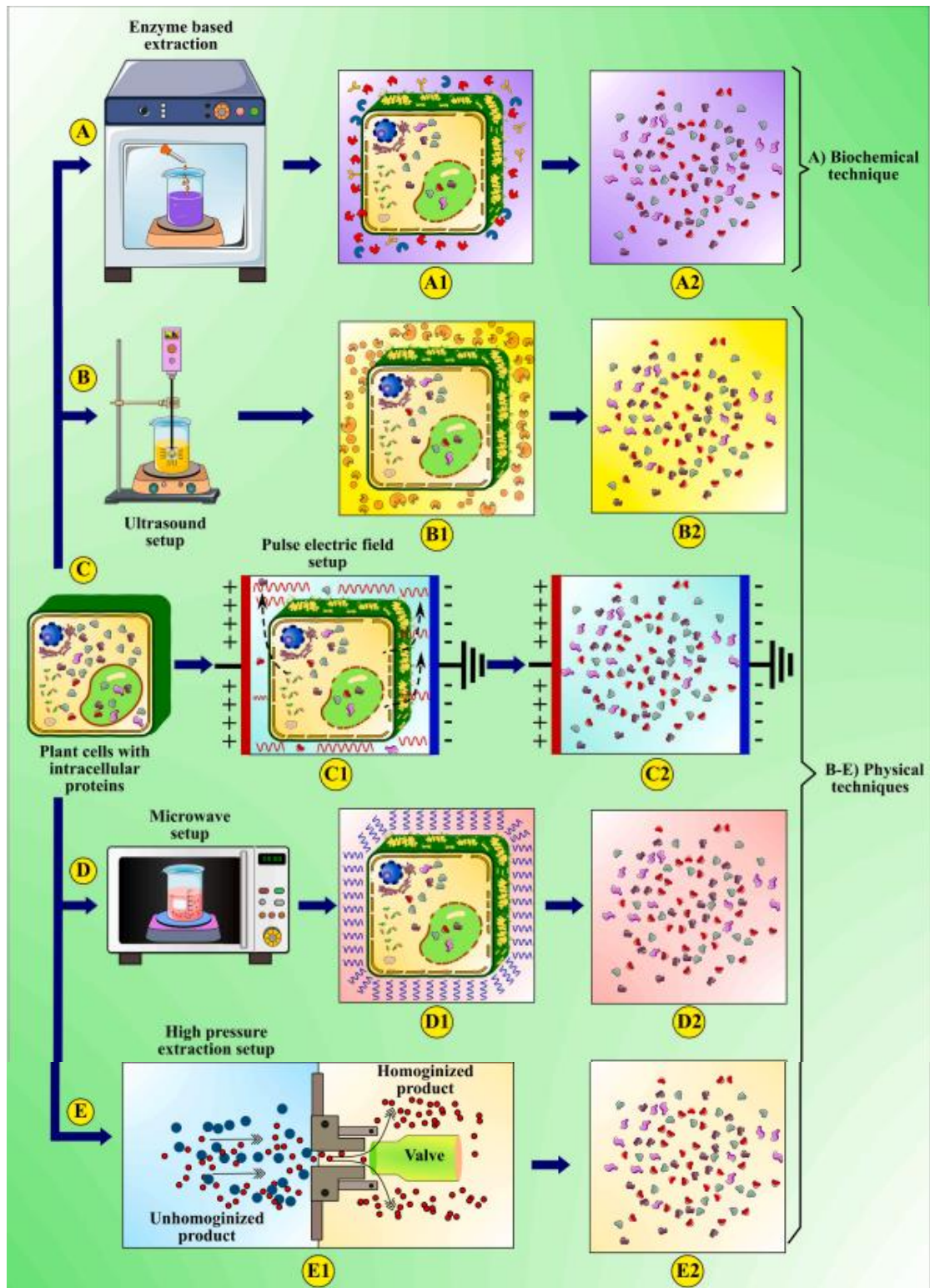
2.4.5 Εκχύλιση πρωτεϊνών με υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid extraction (SFE))

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE) έχει προσελκύσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιείται σε περιβαλλοντικές, φαρμακευτικές, εφαρμογές και στην ανάλυση τροφίμων. Στη βιομηχανία τροφίμων χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η απομάκρυνση της καφεΐνης του τσαγιού και του καφέ και η απομάκρυνση των φυτοφαρμάκων που έχει το ρύζι. (Inês et al., 2021). Το υπερκρίσιμο ρευστό παρουσιάζει ιδιότητες που μοιάζουν με υγρό και αέριο πάνω από το κρίσιμο σημείο της θερμοκρασίας του και της πίεσης. Η ισχύς διαλύτη και η αμελητέα επιφανειακή τάση παρόμοιες ιδιότητες με αυτές ενός υγρού και η υψηλή διαχυτικότητα και το χαμηλό ιξώδες παρόμοιες ιδιότητες με αυτές ενός αερίου. Εξαιτίας της μεσοφασικής φύσης του ρευστού και των ιδιοτήτων που το χαρακτηρίζουν εύκολα διεισδύει στο υπόστρωμα και διαλύει την επιθυμητή ένωση με ταχύτατο ρυθμό αποτελώντας έναν εξαιρετικό διαλύτη. Ένα υπερκρίσιμο ρευστό εξαρτάται από τη πίεση και τη θερμοκρασία του συστήματος (Inês et al., 2021; Patil et al., 2021).

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης. Η ασφάλεια λόγω της αδράνειάς του, όπως έχει αναγνωριστεί από τον FDA, ασφαλές για την ανθρώπινη υγεία, η μεγάλη διαθεσιμότητα και το χαμηλό κόστος είναι μερικά πλεονεκτήματα. Η δυνατότητα της χρήσης τους σε σχετικά χαμηλές πιέσεις και θερμοκρασίες συμβάλλει στη διατήρηση θερμοευαίσθητων ενώσεων ανώτερης ποιότητας και καλής λειτουργικότητας. Η κρίσιμη θερμοκρασία του CO_2 είναι 31°C και η χαμηλή κρίσιμη πίεση 74 bar

ενώ συνήθως παρέχει τη δυνατότητα λειτουργίας σε μέτριες πιέσεις μεταξύ 100 και 450 bar. Ωστόσο θερμοκρασίες έως και 70°C έχουν χρησιμοποιηθεί σε υπερκρίσιμο ρευστό. Η παρουσία υψηλής θερμοκρασίας βελτιώνει τη πίεση των ατμών της διαλυμένης ουσίας ενισχύοντας την απόδοση της εκχύλισης ενώ παράλληλα μειώνει τη πυκνότητα του διαλύτη και τη δύναμη διαλυτοποίησης (Cláudia da Costa Rocha et al., 2021; Inês et al., 2021; Picot-allain et al., 2021).

Η χρήση υπερκρίσιμων ρευστών ακόμη προτιμάται να συνδυάζεται και με άλλες διεργασίες για τη λήψη βέλτιστων εκχυλισμάτων χωρίς υπολείμματα διαλυτών και φιλικών προς το περιβάλλον κλασμάτων από τα έντομα που αποτελούν μια κατηγορία πολλά υποσχόμενη στη βιομηχανία τροφίμων (Cláudia da Costa Rocha et al., 2021). Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η χρήση των υπερκρίσιμων ρευστών με υποβοήθεια ενζύμων. Με την προεπεξεργασία της πρώτης ύλης με ένζυμα παρατηρείται στην εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα λόγω της αυξημένης διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος που ωθεί στην απελευθέρωση βιοενεργών ουσιών (Patil et al., 2021).



Εικόνα 2.3: Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών. Α) Βιοχημική μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εκχύλιση πρωτεΐνης με τη χρήση ενός μόνο ή μείγματος πολλαπλών ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τον φραγμό του κυτταρικού τοιχώματος (Α1) και βοηθούν στην απελευθέρωση των πρωτεϊνικών συστατικών στο περιβάλλον μέσο (Α2). Β, Γ, Δ και Ε είναι οι φυσικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών από τις φυτικές μήτρες. Όπου, Β) Εκχύλιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια υπερήχων (UAE). Η ενέργεια

κύματα από τους υπερήχους οδηγούν στο σχηματισμό φυσαλίδων σπηλαίωσης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος, διασπώντας τελικά το κυτταρικό τοίχωμα (B1) και τη μεμβράνη του κυττάρου απελευθερώνοντας ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες στον περιβάλλοντα διαλύτη (B2). Γ) Εκχύλιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (PEF). Στην τεχνική αυτή τα φυτικά δείγματα υποβάλλονται σε υψηλή ένταση ηλεκτρικού πεδίου για μικρή χρονική διάρκεια από μικρο- έως χιλιοστά του δευτερολέπτου (Γ1). Αυτά τα ηλεκτρικά πεδία δημιουργούν πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και βοηθούν στην απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών στον διαλύτη εκχύλισης, βελτιώνοντας έτσι τις αποδόσεις εκχύλισης (C2). D) Εκχύλιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE). Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες που παράγονται στο σύστημα μικροκυμάτων ενισχύουν τη διάσπαση του διαλύτη στη φυτική μήτρα (D1) και διευκολύνουν τη μετακίνηση των διαλυτών πρωτεϊνών στον διαλύτη, αυξάνοντας την ανάκτηση της πρωτεΐνης (D2). E) Εκχύλιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια υψηλής πίεσης (HPE). Η πίεση αποσυνθέτει τις φυτικούς ιστούς και κύτταρα διασπώντας το κυτταρικό τοίχωμα (E1), αυτό ενισχύει τη μεταφορά μάζας των περιβαλλόντων διαλυτών στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και βελτιώνει την εκχύλιση αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των πρωτεϊνών (E2).

Πηγή: (Kumar et al., 2021)

3. Εφαρμογές στα προϊόντα τροφίμων

3.1 Εφαρμογές των φυτικών πρωτεϊνών

Οι ιδιότητες των φυτικών πρωτεϊνών είναι γνωστές στη παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων. Μερικά παραδείγματα αποτελούν: Η σόγια για τις γαλακτωματοποιητικές της ικανότητες, για τη συμβολή της στη ζελατινοποίηση και στη βέλτιστη υφή των τροφίμων που παράγει, ειδικά σε βιομηχανίες κρέατος. Ο αρακάς ο οποίος έχει κατακτήσει την Ευρώπη ως μη γενετικά τροποποιημένο προϊόν. Το σιτάρι από το οποίο οι πρωτεΐνες που παραλαμβάνονται χρησιμοποιούνται συχνά στη βιομηχανία κρέατος για τη συμβολή τους στη δομή των τελικών προϊόντων αλλά και για τις γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και τη δυνατότητα δέσμευσης νερού. Σταδιακά χρησιμοποιούνται οι φυτικές πρωτεΐνες στη βιομηχανία ,συγχρόνως με τον εμπλουτισμό των τροφών που προκύπτει και για οικονομικούς λόγους (Tarté, 2009).

Έχουν διεξαχθεί έρευνες με σκοπό την αξιολόγηση της καταλληλότητας των φυτικών πρωτεϊνών να αποτελέσουν εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών. Τα συμπυκνώματα πρωτεϊνών σόγιας αποτελούν παραπροϊόντα της παραγωγής

του σογιέλαιου, και συχνά χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή. Μέσα από μία ερευνητική διαδικασία αρκετών δεκαετιών, οι σπόροι σόγιας βελτιώθηκαν σημαντικά και η πρωτεΐνη σόγιας βρήκε εφαρμογή ως εναλλακτική πρωτεΐνη στην παραγωγή γαλακτοκομικών ζυμωμένων ποτών, ή ως συστατικό σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως είναι τα υποκατάστατα κρέατος ή τα μη γαλακτοκομικά βρεφικά σκευάσματα (Jiménez-Munoz et al., 2021).

Ένας σημαντικός αριθμός ερευνών έχει ασχοληθεί με την ενσωμάτωση αλεύρου οσπρίων, το οποίο είναι πλούσιο σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, σε προϊόντα τροφίμων, ειδικά σε προϊόντα αρτοποιίας, όπως ψωμί ή μπισκότα, καθώς και προϊόντα εξωθήσεως. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξωθημένων προϊόντων αποτελεί το καλαμπόκι, η φακή ή η ανάμιξη αυτών για τα οποία έχουν διεξαχθεί μελέτες παλαιότερα. Βρέθηκε το 2010 πως ενώ το χρώμα των προϊόντων επηρεάστηκε από την αναλογία της φακής προς το καλαμπόκι η θερμοκρασία εξωθήσεως βελτίωσε τη τραγανότητα και τη τήξη των τελικών προϊόντων. Ακόμη η σκληρότητα συσχετίστηκε αρνητικά με την αλευρώδη γεύση και τη τραγανότητα. Συμπερασματικά, με το κατάλληλο χειρισμό των συνθηκών δίνεται η ικανότητα παραγωγής προϊόντων εξωθήσεως με οποιαδήποτε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. (Lazou et al., 2010).

Στο ψωμί, ο εμπλουτισμός με πρωτεΐνη μπιζελιών επιτρέπει την ανάδειξη της υφής, της συνοχής και της ελαστικότητας της ζύμης. Ταυτόχρονα, βοηθάει στη διαμόρφωση ενός ολοκληρωμένου προφίλ αμινοξέων (Garcia-Segovia et al., 2020).

Για παράδειγμα, οι Millar et al. (2019) αξιολόγησαν τη δυνατότητα αντικατάστασης μέρους του αλευριού σίτου (30%) με αλεύρι από μπιζέλια κατά την παραγωγή λευκού ψωμιού. Το αλεύρι μπιζελιού σχηματίστηκε από μπιζέλια τα οποία αφού αρχικά εκβλάστησαν στη συνέχεια οδηγήθηκαν σε θερμική επεξεργασία (ψήσιμο) και στη συνέχεια τα άλεσαν. Οι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας του ψωμιού κατά 2,4% (από 8,4% σε 10,8%). Το ψήσιμο του βελτίωσε τις τεχνο-λειτουργικές ιδιότητες του αλευριού από μπιζέλια, ενώ ο ειδικός όγκος του λευκού ψωμιού που παράχθηκε ήταν συγκρίσιμος με το ειδικό όγκο του λευκού ψωμιού από 100% αλεύρι σίτου (Millar et al., 2019).

Το αλεύρι μπιζελιού χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, κατάλληλα για αθλητές ή ηλικιωμένους (Jiménez-Munoz et al., 2021).

Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι φυτικές πρωτεΐνες είναι ότι επηρεάζουν σημαντικά την δομή και την υφή των τροφίμων που προστίθενται, μειώνοντας την αποδοχή των καταναλωτών. Η τεχνολογική έρευνα εστιάζει σε μεγάλο βαθμό στην υπέρβαση αυτών των προκλήσεων. Επίσης, μαζί με τις φυτικές πρωτεΐνες συχνά συνυπάρχουν ορισμένοι αντιθρεπτικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα πεπτικότητας ή να μειώσουν τη βιολογική αξία των φυτικών πρωτεϊνών (Jiménez-Munoz et al., 2021).

3.2 Εφαρμογές των πρωτεϊνών που παράγονται από έντομα

Συχνά τα βρώσιμα έντομα καταναλώνονται σε άρτια μορφή, μαγειρεμένα με διάφορους τρόπους. Δεδομένης της ποικιλομορφίας που υπάρχει στα είδη εντόμων δεν είναι εφικτό να βρεθεί ο ακριβής αριθμός των επιτρεπτών για κατανάλωση (σε τροφή ή ζωοτροφή) ειδών (Yen, 2015). Θεωρείται ωστόσο πως περισσότερα από 2000 είδη εντόμων καταναλώνονται κυρίως στις τροπικές περιοχές και περισσότερα από 1900 παγκοσμίως κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η Αφρική, η Νοτιοανατολική Ασία, η Λατινική Αμερική και η Αυστραλία είναι μέρη του κόσμου στα οποία έχει εξετασθεί η εντομοφαγία εκτενώς. Στις μέρες μας 130 χώρες χρησιμοποιούν καθημερινά τα έντομα στο διαιτολόγιό τους (Costa-Neto & Dunkel, 2016). Τουλάχιστον 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι καταναλώνουν έντομα τακτικά (Pal & Roy, 2014).

Δεν καταναλώνονται όμως όλα τα έντομα σε κάθε περιοχή. Οι κάμπιες του σατυρικού σκόρου (μεταξοσκώρος), οι προνύμφες (προνύμφες σκαθαριών), οι ακρίδες, και οι γρύλοι είναι έντομα που καταναλώνονται σχεδόν παντού. Οι ενήλικες λιβελούλες καταναλώνονται μόνο στη νοτιοανατολική Ασία και ορισμένες μύγες καταγράφονται από ορισμένες κοινότητες ιθαγενών Αμερικανών στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τα διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης ενός είδους εντόμου μπορούν να επηρεάσουν την edώδιμη ύλη. Τα παραδείγματα είναι οι ενήλικες τερμίτες ή προνύμφες και τα κουκούλια σφήκας. Σε άλλες περιπτώσεις, εκμεταλλεύονται σχεδόν όλα τα στάδια όπως

νεαρές και ενήλικες ακρίδες και γρύλοι ή αυγά, προνύμφες, κουκούλια μυρμηγκιών και ενήλικες. Μέρος της διατροφής για τη διαβίωση στις φυλές της Αφρικής και της Αυστραλίας αποτελούν τα μυρμηγκία και οι προνύμφες σκαθαριών. Αρκετά δημοφιλείς είναι η κατανάλωση τραγανών τηγανιτών



Εικόνα 3.1: Μπάλες βρώμης με έντομα

Πηγή: (Chow et al., 2021)

ακρίδων και σκαθαριών στην Ταϊλάνδη (Pal & Roy, 2014; Arnold Van Huis, 2013, 2016).

Στις τροπικές περιοχές η εκτροφή εντόμων είναι σύνηθες φαινόμενο, ωστόσο στον δυτικό κόσμο τα έντομα δεν θεωρούνται τροφή και υπάρχει νεοφοβία. Οι ρίζες της παραδοσιακής κουζίνας στη δυτική κοινωνία δεν περιλαμβάνουν έντομα και συχνά θεωρούνται παράσιτα, βρωμιά ή και φορέας ασθένειας (Chow et al., 2021; Costa-Neto & Dunkel, 2016).

Οι Chow et al. (2021) μελέτησαν βρώσιμα έντομα και τις αντιδράσεις των παιδιών σε αυτά. Στην έρευνα εξετάστηκαν τα αποτελέσματα των απτικών αλληλεπιδράσεων λόγω των δραστηριοτήτων μαγειρικής με

βρώσιμα έντομα. Δύο έντομα, η ακρίδα και ο σκώληκας του αλεύρου, χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή δανέζικου σνακ (havregrynskugler), τις μπάλες βρώμης. Τα παιδιά δεν ήταν απρόθυμα να συμμετέχουν στην μαγειρική δραστηριότητα αλλά η νεοφοβία τα επηρέασε να προβούν σε δοκιμή. Υπήρξαν αρκετά που θέλησαν να δοκιμάσουν την πρώτη φορά ενώ μειώθηκε ο αριθμός του δείγματος στη δεύτερη γευστική δοκιμή. Οι χαμηλές προσδοκίες των παιδιών οδήγησαν σε υψηλότερη βαθμολογία των σνακ στη πρώτη δοκιμή από την αναμενόμενη για τη γεύση του σνακ. Η εκδοχή με το σκώληκα του αλεύρου χαρακτηρίστηκε πιο εύγεστη από αυτή με την ακρίδα (Chow et al., 2021).



Εικόνα 3.2: Αλληλεπίδραση αφής με έντομα (a) ακρίδα και (b)σκώληκας του αλεύρου

Πηγή: (Chow et al., 2021)

Οι Garcia-Segovia et al (2020) πραγματοποίησαν μελέτη όπου αξιολόγησαν τον εμπλουτισμό σκευασμάτων με βάση το σιτάρι σε πρωτεΐνη. Χρησιμοποίησαν μια φυτική πηγή πρωτεϊνών (αλεύρι από μπιζέλια) και σκόνη εντόμων (σκουλήκι αλεύρου *Tenebrio molitor* L. και σκουλήκι *Alphitobius diaperinus*). Αναλύθηκαν οι ιδιότητες του ζυμαριού σε αλβεογράφο, καθώς και η επίδραση στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων άρτων. Παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και κατά συνέπεια βελτίωση της θρεπτικής αξία του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, η εκτατότητα του ζυμαριού, η αντοχή και η αναλογία αντοχής προς εκτατότητα αυξήθηκαν σημαντικά με την παρουσία του αλεύρου μπιζελιού. Η υφή του άρτου μεταβλήθηκε σημαντικά. Η παρουσία αλευριού μπιζελιού έδωσε αυξημένες τιμές σκληρότητας. Το αλεύρι από μπιζέλι και η σκόνη εντόμων προκάλεσαν αλλαγές στην κόρα του άρτου, ενώ το χρώμα της ψίχας αλλοιώθηκε (Garcia-Segovia et al., 2020).

3.3 Εφαρμογές των πρωτεϊνών που παράγονται από μικροοργανισμούς

Οι πρωτεΐνες μικροβιακής φύσεως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή ζωοτροφών ή ως πρόσθετα τροφίμων. Μικροφύκη, ζυμομύκητες, μύκητες και βακτήρια αφήνουν χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα συγκριτικά με τις υπόλοιπες εναλλακτικές ή συμβατικές πρωτεΐνες. Οι μικροοργανισμοί, και ιδιαίτερα οι ζυμομύκητες και τα γαλακτικά βακτήρια, έχουν αποτελέσει παραδοσιακά βασικό και απαραίτητο συντελεστή σε βασικές τεχνικές επεξεργασίας, όπως η ζύμωση της ζύμης, του κρασιού, της

μπύρας, αλλά και κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το τυρί και το γιαούρτι. Κατά τη δεκαετία 1960-1970, η κοινή γνώμη και η επιστημονική κοινότητα ευαισθητοποιήθηκαν για πρώτη φορά απέναντι στην αναμενόμενη παγκόσμια δημογραφική έκρηξη και στη ανάγκη να βρεθεί ένας τρόπος να καλυφθούν οι διατροφικές ανάγκες του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού. Αναζητήθηκαν εναλλακτικές πηγές ζωοτροφών και τροφίμων και έγιναν σημαντικές προσπάθειες να παραχθούν πρωτεϊνικά πρόσθετα ανωτέρας ποιότητας από μικροοργανισμούς (μικροβιακή πρωτεΐνη ή μονοκυτταρική πρωτεΐνη) με υποστρώματα τα οποία είχαν χαμηλό κόστος και μεγάλη αφθονία, όπως η μεθανόλη ή το μεθάνιο (Matassa et al., 2016).

Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ορισμένων βιολογικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα βιοπολυμερή, όπως τα πολυυδροξυαλκάνια, θεωρούνται μία βιολογική εναλλακτική των χημικών που έχουν ως βάση το πετρέλαιο στην παραγωγή πλαστικών. Βιομηχανική εφαρμογή δεν έχει ακόμη πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα. Επίσης, το πολυυδροξυβουτικό βρίσκει εφαρμογή στις υδατοκαλλιέργειες ως συμπλήρωμα ζωοτροφής, καθώς θεωρείται ότι έχει πρεβιοτική δράση (Matassa et al., 2016).

Η πρωτεΐνη από μικροοργανισμούς μπορεί να λειτουργήσει ως εναλλακτική πρωτεΐνη των ιχθυάλευρων που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές ή στις υδατοκαλλιέργειες. Επίσης, πρόκειται για μία εναλλακτική λύση που μπορεί να φανεί χρήσιμη ακόμη και ως τροφή του ανθρώπου καθώς περιέχει το σύνολο των βασικών και απαραίτητων αμινοξέων. Για παράδειγμα, το Quorn™ είναι μία μυκοπρωτεΐνη που διατίθεται στην αγορά 15 χωρών (εικόνα 3.1), με ετήσια παραγωγή και διάθεση 25.000 τόνους, με αξία 214 εκατομμύρια ευρώ που αναμένεται να σημειώσει σημαντική άνοδο, ακόμη και ως 20% τα επόμενα χρόνια (Matassa et al., 2016).



Εικόνα 3.3: Κύβοι Quorn

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Quorn>

Ο άνθρωπος καταναλώνει τα μικροφύκη σε μορφή σκόνης, ως δισκία, κάψουλες ή υγρό διάλυμα. Θεωρούνται ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία, καθώς σύμφωνα με έρευνες, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, βοηθούν την ανάπτυξη του εγκεφάλου, ρυθμίζουν την υπερχοληστερολαιμία, συμμετέχουν στην παραγωγή των αιμοσφαιρίων και της προβιταμίνης Α. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των μικροφυκών είναι ότι μπορούν να καλλιεργηθούν σε περιοχή όπου το έδαφος, το νερό ή το κλίμα δεν είναι κατάλληλα για συμβατική καλλιέργεια με αποτέλεσμα ο πληθυσμός της περιοχής να μην μπορεί να καλύψει τις διατροφικές του ανάγκες (Amorim et al., 2021).

Επίσης, στη βιομηχανία τροφίμων η προσθήκη βιομάζας μικροφυκών σε ένα τρόφιμο κατά την παραγωγική διαδικασία οδηγεί σε βελτίωση της θρεπτικής αξίας του. Στην αρτοποιία, η εφαρμογή μικροφυκών είναι μία πολλά υποσχόμενη διαδικασία. Έχει παρατηρηθεί ότι *C. vulgaris* και το *A. platensis* που εφαρμόστηκαν σε κριτσίνια από τους Uribe-Wandurraga et al. (2019) παρατηρήθηκε αυξάνουν την περιεκτικότητα σε σίδηρο και σελήνιο των τελικών προϊόντων, ενώ βελτίωσαν τη σταθερότητα του χρώματος και της υφής. (Uribe-Wandurraga et al., 2019). Οι Hossain et al. (2017) χρησιμοποίησαν βιομάζα *H. pluvialis*, η οποία είναι πλούσια σε ασταξανθίνη (κετο-καροτονοειδές) σε μπισκότα από αλεύρι ολικής άλεσης, και παρατήρησαν ότι βελτιώθηκαν οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, καθώς και η απελευθέρωση γλυκόζης (Mofasser Hossain et al., 2017).

Μικροφύκη έχουν προστεθεί επίσης σε γιαούρτι και ζυμαρικά, τα οποία βελτίωσαν τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των τελικών προϊόντων. Οι Till et al (2019) χορήγησαν διαφορετικές ποσότητες μικροφυκών, Schizochytrium limacinum, σε αγελάδες που προορίζονται για γαλακτοπαραγωγή και αξιολόγησαν την αύξηση της περιεκτικότητας σε μακρά αλυσίδα ω-3 λιπαρά οξέα στο παραγόμενο γάλα και την επίδραση τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου τυριού από το γάλα αυτό. Παρατηρήθηκε αύξηση των πολυακόρεστων και των ω-3 λιπαρών οξέων στο γάλα με ταυτόχρονη μείωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, γεγονός που μπορεί να δράσει ευεργετικά στην ανθρώπινη υγεία. Παρατηρήθηκαν ωστόσο μεταβολές στο παραγόμενο από το γάλα τυρί τσένταρ, όπως αυξημένος θρυμματισμός και ταυτόχρονη μείωση της κρεμώδους γεύσης, με εντονότερη γεύση ξηρών καρπών (Till et al., 2019).

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα, που οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τα μικροφύκη παρουσιάζουν συγκριτικά με τις περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες, είναι ότι έχουν υψηλότερη ικανότητα αφρισμού, γαλακτωματοποίησης και σταθεροποίησης (Amorim et al., 2021).

3.4 Αποδοχή των εναλλακτικών πρωτεϊνών από τους καταναλωτές

Οι διατροφικές συνήθειες και τα διατροφικά πρότυπα που αναπτύσσουν οι καταναλωτές, επηρεάζουν σημαντικά την αποδοχή ή την απόρριψη μίας εναλλακτικής πρωτεϊνικής πηγής.

Το καταναλωτικό κοινό αποδέχεται πιο εύκολα τις εναλλακτικές πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης από ότι τις εναλλακτικές πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης. Σε συστηματική ανασκόπηση που πραγματοποίησαν οι Onwezen et al. (2021), εντόπισαν 91 άρθρα που δίνουν έμφαση στην αποδοχή από το καταναλωτικό κοινό εναλλακτικών πρωτεϊνών από πέντε διαφορετικές πηγές προέλευσης: όσπρια, λοιπές φυτικές πρωτεΐνες, έντομα, φύκια και κρέας κυτταροκαλλιέργειας. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι συγκριτικά με το κρέας, το καταναλωτικό κοινό αποδέχεται τις εναλλακτικές πρωτεΐνες με μεγαλύτερη δυσκολία. Οι πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, είτε από όσπρια είτε από άλλα είδη φυτών, όπως σιτηρά, ξηρούς καρπούς, φρούτα ή λαχανικά, έχουν

ευκολότερη αποδοχή από τα έντομα. Οι παράγοντες, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη ανασκόπηση, που οδηγούν στην αποδοχή μίας κατηγορίας εναλλακτικών πρωτεϊνών σχετίζεται με την ποιότητα, τον οργανοληπτικό χαρακτήρα, τη διατροφική αξία, την επίδραση στην υγεία, την οικειότητα, τη διατροφική νεοφοβία και τους κοινωνικούς κανόνες. Ωστόσο, κάθε παράγοντας επηρεάζει διαφορετικά τη γνώμη του καταναλωτή. Για παράδειγμα, η αποδοχή των εντόμων ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών σχετίζεται με την εξοικείωση, αλλά και με τις συναισθηματικές διεργασίες στις οποίες υποβάλλεται ο καταναλωτής, όπως είναι ο φόβος ή η αποστροφή προς τα έντομα και η αντιμετώπισή τους (Onwezen et al., 2021).

Ένα ποσοστό καταναλωτών αποδέχεται την κατανάλωση των εναλλακτικών πρωτεϊνών σαν μία συνειδητή επιλογή. Το καταναλωτικό αυτό κοινό συνήθως αποτελείται από άτομα που αποφάσισαν να υιοθετήσουν μία διαφορετική διατροφή όπου η κατανάλωση κρέατος περιορίζεται σε ποσότητα ή/και συχνότητα ή απορρίπτεται πλήρως, όπως οι χορτοφάγοι ή αυστηρώς χορτοφάγοι (vegetarian / vegan). Στις περιπτώσεις αυτές, οι πρωτεΐνες του κρέατος αντικαθίστανται από εναλλακτικές πηγές, όπως υποκατάστατα κρέατος ή φύκια ή όσπρια (Onwezen et al., 2021).

Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποδοχή ή την απόρριψη ενός προϊόντος που περιέχει εναλλακτικές πρωτεΐνες μπορούν να αφορούν το προϊόν, δηλαδή τα χαρακτηριστικά του και την εξοικείωση που έχει ο καταναλωτής με αυτό, την ανθρώπινη ψυχολογία, αλλά και κοινωνικά ή πολιτισμικά χαρακτηριστικά (Onwezen et al., 2021).

3.4.1 Παράγοντες αποδοχής που αφορούν το προϊόν

Η αποδοχή ενός προϊόντος από τους καταναλωτές σχετίζεται άμεσα με ορισμένα από τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, όπως είναι η καλή υγιεινή του κατάσταση, η γεύση, η ευκολία πρόσβασης, τα πιθανά περιβαλλοντικά οφέλη που προσφέρει, τα οφέλη στην υγεία και η εμφάνιση.

Στην επιλογή και αποδοχή των εναλλακτικών πρωτεϊνών από τους καταναλωτές, σημασία έχει και η συσχέτιση της υπερκατανάλωσης του κρέατος με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και με την εμφάνιση προβλημάτων υγείας. Έτσι, η υπερκατανάλωση του κρέατος έχει αποδειχθεί ότι οδήγησε σε μία εντατικοποίηση της κτηνοτροφίας ώστε να καλυφθούν πλήρως οι ανάγκες

του παγκόσμιου πληθυσμού. Η ραγδαία, όμως, ανάπτυξη της κτηνοτροφίας συσχετίστηκε (van der Weele et al., 2019):

- Με τη μείωση της βιοποικιλότητας, καθώς όλο και περισσότερες εκτάσεις χρησιμοποιούνται για την κάλυψη των αναγκών των ζώων σε ζωοτροφές ή για κτηνοτροφικές δραστηριότητες.
- Με την αύξηση των αγροτικών δραστηριοτήτων, καθώς τα ζώα χρειάζονται τροφή για να επιβιώσουν.
- Με την αυξημένη παραγωγή αερίων ρύπων (CO₂ και CH₄, κυρίως) με αποτέλεσμα να ενισχύεται το φαινόμενο του θερμοκηπίου και να επιταχύνεται η κλιματική αλλαγή.
- Με την υπερκατανάλωση νερού, λόγω αύξησης κτηνοτροφικών και αγροτικών δραστηριοτήτων (πότισμα ζώων, καθάρισμα κτηνοτροφικών μονάδων, άρδευση).
- Με την υπερ-εκμετάλλευση των ζώων, η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε άσχημες συνθήκες διαβίωσης των ζώων.
- Με την ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικών μικροοργανισμών. Τα αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία εκτός από την αντιμετώπιση ή την πρόληψη ασθενειών χρησιμοποιούνται και για την αύξηση του βάρους των ζώων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2006, η χορήγηση αντιβιοτικών ως αυξητικός παράγοντας έχει απαγορευτεί, ωστόσο η συνολική ποσότητα κατανάλωσης αντιβιοτικών για τα παραγωγικά ζώα είναι αυξημένη.

Επίσης, η υπερκατανάλωση του κρέατος συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ορισμένων παθήσεων του ανθρώπου, όπως υπερχοληστερολαιμία, καρδιαγγειακές παθήσεις ακόμη και αυξημένες πιθανότητες καρκινογένεσεων, όπως είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου (van der Weele et al., 2019).

Επίσης, υπάρχουν και ορισμένα προσωπικά κριτήρια που αναπτύσσει ο καταναλωτής, όπως για παράδειγμα, ορισμένες ιδιαίτερες διατροφικές συνθήκες ή ανάγκες. Έτσι, ένας καταναλωτής αποδέχεται ευκολότερα τις εναλλακτικές πρωτεΐνες αν για παράδειγμα έχει υιοθετήσει μία χορτοφαγική διατροφή, λιγότερο ή περισσότερο αυστηρή, ή αν υπάρχουν ιατρικοί λόγοι, όπως αλλεργίες ή δυσανεξίες σε ορισμένα συστατικά του κρέατος (Onwezen et al., 2021).

Τα κίνητρα που έχει ένα άτομο όταν επιλέγει για δοκιμή (μία φορά) την κατανάλωση ενός προϊόντος με εναλλακτικές πρωτεΐνες είναι σημαντικά διαφορετικά από τα κίνητρα που οδηγούν σε μία επαναλαμβανόμενη κατανάλωση. Για παράδειγμα, σε μία έρευνα του House (2016) στην Ολλανδία, για την χαμηλή αποδοχή της κατανάλωσης εντόμων από τον δυτικό κόσμο, κατά την αρχική δοκιμή, οι παράγοντες που επηρέαζαν τον καταναλωτή ήταν κυρίως ψυχολογικοί (φόβος ή αποστροφή, περιέργεια), αλλά η επαναλαμβανόμενη κατανάλωση είχε σχέση πιο πολύ με τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, όπως είναι η τιμή, η διαθεσιμότητα, η εύκολη πρόσβαση, η γεύση (House, 2016).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες αποδοχής των εναλλακτικών πρωτεϊνών είναι η εξοικείωση, η τάση δηλαδή του ατόμου να υιοθετεί παρόμοια συμπεριφορά και να καταφεύγει σε οικείες επιλογές. Η αποδοχή προϊόντων με βάση τα όσπρια, τα έντομα, τα φύκια ή το καλλιεργημένο κρέας απαιτούν εξοικείωση με τα προϊόντα αυτά, καθώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (γεύση, υφή, εμφάνιση) συχνά αποτελούν νέα προϊόντα τα οποία δεν είναι πάντα εύκολα προσβάσιμα (Onwezen et al., 2021).

Οι Woolf et al. (2019) πραγματοποίησαν μία έρευνα στις ΗΠΑ με σκοπό να εντοπίσουν τους παράγοντες που επηρεάζουν την διάθεση των καταναλωτών να δοκιμάσουν τροφές με έντομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προηγούμενη κατανάλωση (εξοικείωση) ενός προϊόντος που περιείχε έντομα και η ενημέρωση για τα οφέλη στην υγεία που προκαλεί η εντομοφαγία, επηρέασαν θετικά την προθυμία για μία δοκιμή. Από τους συμμετέχοντες το 74,1% δεν είχαν ποτέ δοκιμάσει προϊόντα που περιείχαν έντομα, ενώ ένα ποσοστό 7,8% κατανάλωναν περιστασιακά ή τακτικά τροφές με έντομα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των συμμετεχόντων στην έρευνα οι οποίοι δεν είχαν δοκιμάσει ποτέ να καταναλώσουν τροφές που περιείχαν έντομα (67% όσων δεν είχαν προηγούμενη εμπειρία) δήλωσαν ότι αποστρέφονται την ιδέα κατανάλωσης εντόμων. Από αυτούς που είχαν δοκιμάσει τουλάχιστον μία φορά, ένα σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό καταναλωτών (35%) δήλωσε αποστροφή στην ιδέα της εντομοφαγίας (Woolf et al., 2019).

3.4.2 Ψυχολογικοί παράγοντες

Η αποδοχή των εναλλακτικών πρωτεϊνών στη διατροφή των καταναλωτών σχετίζεται με τη συμπεριφορά - στάση του καταναλωτή, την τροφική νεοφοβία και την αποστροφή (Onwezen et al., 2021).

Η στάση που τηρεί ένας καταναλωτής απέναντι σε νέα εναλλακτικά προϊόντα, επηρεάζει σημαντικά την αποδοχή ή την απόρριψη των προϊόντων αυτών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι καταναλωτές που έχει προαποφασίσει να τηρήσουν μία αρνητική στάση απέναντι σε προϊόντα με βάση εναλλακτικές μορφές πρωτεϊνών, δείχνουν απροθυμία πληρωμής των προϊόντων, ακόμη και αν κατά την πρώτη δοκιμή φανούν ανώτερα των προσδοκιών τους (Lombardi et al., 2019). Επίσης, όσο πιο συνεπής καταναλωτής κρέατος είναι κάποιος και όσο πιο θετική στάση τηρεί απέναντι στην κατανάλωση κρέατος, τόσο πιο δύσκολα αποδέχεται ένα προϊόν που περιέχει εναλλακτικές πρωτεΐνες (Hoek et al., 2011). Συναισθηματικός οδηγός για την κατανάλωση καινοτόμων εναλλακτικών πρωτεϊνών συχνά είναι η οικογένεια και οι φίλοι, όπου η αρνητική αξιολόγηση μπορεί να οδηγήσει στην υιοθέτηση αρνητικής στάσης (Onwezen et al., 2021).

Με τον όρο τροφική νεοφοβία νοείται η απροθυμία δοκιμής ή η αποφυγή της κατανάλωσης νέων τροφών. Στην περίπτωση κατανάλωσης εναλλακτικών πρωτεϊνών παραγόμενων από μικροοργανισμούς, συχνά παρουσιάζεται φόβος για την ασφάλεια του προϊόντος ή για την υγεία του καταναλωτή (Onwezen et al., 2021).

Η αποστροφή, το συναίσθημα της αηδίας, αποτελεί συχνά ανασταλτικό παράγοντα για την κατανάλωση τροφών με βάση τα έντομα και, σε μικρότερο βαθμό, με βάση τα φύκη (Onwezen et al., 2021).

3.4.3 Παράγοντες κοινωνικοί και πολιτισμικοί

Ορισμένοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη αποδοχή των προϊόντων με βάση τις εναλλακτικές πρωτεΐνες σχετίζονται με το κοινωνικό περιβάλλον, το πολιτισμικό υπόβαθρο και με την εμπιστοσύνη που μπορεί να δείξει ο καταναλωτής στο προϊόν.

Από μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ εμπιστοσύνης και αποδοχής των τροφών με βάση τις εναλλακτικές πρωτεΐνες. Αν μία περιοχή δείχνει δυσπιστία απέναντι στην επιστήμη, η αποδοχή είναι μικρότερη. Αν

ένας επίσημος φορέας, όπως ένα δημόσιο ίδρυμα υγείας, δείξει ότι στηρίζει ένα προϊόν και πληροφορεί το καταναλωτικό κοινό για αυτό, η εμπιστοσύνη, άρα και η αποδοχή αυξάνονται (Onwezen et al., 2021).

Σημαντικά επίσης είναι τα κοινωνικά πρότυπα και οι κοινωνικοί κανόνες που διαμορφώνουν μία ορισμένη συμπεριφορά και στάση απέναντι σε μία καινοτομία ή εναλλακτική λύση. Σύμφωνα με μελέτη των Figueira et al (2019), οι αρνητικές απόψεις της οικογένειας ή των φίλων για τα όσπρια λειτούργησαν σαν εμπόδιο στη δοκιμή συγκεκριμένων τροφών με βάση εναλλακτικές πρωτεΐνες οσπρίων (Figueira et al., 2019). Επίσης, οι Sogari et al (2016) σε έρευνα που πραγματοποίησαν συμπέραναν ότι η πρόθεση για δοκιμή τροφίμων με συστατικό τα έντομα επηρεάζεται σημαντικά από τον κοινωνικό περίγυρο (Sogari et al., 2017).

Τέλος, οι πολιτιστικές παραδόσεις ενός λαού αποτελούν ένα σημαντικότερο παράγοντα αποδοχής ή απόρριψης προϊόντων βασισμένων σε εναλλακτικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η Κίνα αποτελεί μία ευνοϊκή περιοχή για την ανάπτυξη προϊόντων με βάση τα έντομα, καθώς αποτελούν ήδη μέρος της κουλτούρας τους (Onwezen et al., 2021).

4. Συμπεράσματα

Είναι σημαντικό οι εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών να ενταχθούν στο καθημερινό διαιτολόγιο του καταναλωτή. Όλες οι αναφερόμενες εναλλακτικές πηγές χαρακτηρίζονται από τη παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων και την υψηλή ποιότητα των πρωτεϊνών τους. Από τις εναλλακτικές πρωτεΐνες, τη μεγαλύτερη αποδοχή από τους καταναλωτές φαίνεται ότι έχουν οι φυτικές πρωτεΐνες. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από έντομα δεν είναι εύκολα αποδεκτές, ειδικά από το δυτικό κόσμο, λόγω της τροφικής νεοφοβίας και των αρνητικών συναισθημάτων όπως αποστροφή. Παρόλα αυτά, ενέργειες πραγματοποιούνται για την είσοδο τους στις συνήθειες των καταναλωτών. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν μια αναδυόμενη πηγή με ελπιδοφόρες εξελίξεις.

Οι φυτικές πρωτεΐνες μπορούν να προστεθούν σε διάφορα τρόφιμα και να εμπλουτίσουν το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο,.

Η βιώσιμη επιλογή των εντόμων επιφέρει διατροφικά, περιβαλλοντικά και οικονομικά πλεονεκτήματα και μπορούν και οι δυο κατηγορίες να θεωρηθούν σχεδόν ισοδύναμα με το κρέας.

Οι παραπάνω κατηγορίες έχουν βρεθεί ικανές για αντικατάσταση της κύριας πηγής πρωτεϊνών στη δίαιτα των ψαριών, του ιχθυάλευρου, με τα έντομα να μην θεωρούνται καλύτερα σαν επιλογή. Ικανά για την αντικατάσταση αυτού στη βιομηχανία των ζωοτροφών είναι τα βακτήρια. Τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο βιολογικό αποτύπωμα, χαμηλότερο αποτύπωμα άνθρακα, και χαμηλότερο κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τις φυτικές και τις ζωικές πρωτεΐνες.

Άξια σύγκρισης με τη συνήθης ζωική πηγή πρωτεϊνών, το κρέας, είναι η βιωσιμότητα των μυκήτων που βρίσκεται υψηλότερη. Οι μύκητες αποτελούν πηγή μερικώς ή εξ ολοκλήρου πρωτεϊνούχων τροφίμων με πρωτεΐνη βιολογικής αξίας συγκρίσιμη με αυτή των πρωτεϊνών του γάλακτος. Χαρακτηριστικό των μικροφύκη είναι πως βελτιώνουν τις τεχνολογικές ιδιότητες των τροφίμων και το διατροφικό προφίλ αυτών.

Όλες οι εναλλακτικές πηγές που αναφέρονται είναι κατάλληλοι αντικαταστάτες των μέχρι τώρα επικρατέστερων πηγών πρωτεϊνών χωρίς φυσικά να είναι εξίσου ποιοτικές στους εξεταζόμενους τομείς.

Όσον αφορά την επιλογή της πιο αποτελεσματικής μεθόδου εκχύλισης πρωτεϊνών από τις παραπάνω πηγές ο συνδυασμός αποτελεί τη βέλτιστη λύση.

Ο συνδυασμός συμβατικών μεθόδων εκχύλισης με φυσικές μεθόδους, η μέθοδος με τη βοήθεια ενζύμων σε συνδυασμό με περισσότερα του ενός ένζυμα (ειδικά στη περίπτωση της πολυπλοκότητας του υποστρώματος των φύκη), ο συνδυασμός της μη συμβατικής μεθόδου με τη βοήθεια ενζύμων με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης ή και φυσικές είναι οι συνηθέστερες εφαρμογές για την απομόνωση και παραγωγή εναλλακτικών πρωτεϊνών. Παραδείγματα είναι ο συνδυασμός ξήρανσης με μικροκύματα, της χημικής εκχύλισης με μικροκύματα, της εκχύλισης με υποκρίσιμο νερό με ένζυμα, και ο συνδυασμός ενζύμων με φυσικές μεθόδους που έχουν κερδοφόρα αποτελέσματα όπως της υψηλής πίεσης με ένζυμα, της εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό με ένζυμα. Συνδυασμοί μπορούν να γίνουν και μεταξύ

των φυσικών μεθόδων όπως εκχύλισης με υψηλή πίεση σε συνδυασμό με τη βοήθεια μικροκυμάτων ή υπερήχων.

Ο συνδυασμός της μηχανικής επεξεργασίας με τη βοήθεια ενζύμων ενισχύει την αποδοτικότητα και τη ποιότητα της τελικής πρωτεΐνης. Ο συνδυασμός της εκχύλισης με ένζυμα και μικροκύματα συμβάλλει στην αντιμετώπιση όποιας δυσκολίας προκύπτει για τα άκαμπτα βιολογικά δείγματα. Οι συνδυασμοί στην εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό προτιμώνται για τη λήψη πιο καθαρών εκχυλισμάτων χωρίς υπολείμματα διαλυτών.

Οι συμβατικές υγρές μέθοδοι πολλές φορές σε ακραίες τιμές pH έχουν τη δυνατότητα μετουσίωσης της πρωτεΐνης στόχου και σε περίπτωση χημικής εκχύλισης με τη χρήση όξινων διαλυτών μειώνεται η ποιότητα της πρωτεΐνης. Η υψηλή θερμοκρασία μπορεί ακόμη να επιφέρει καταστροφές των θρεπτικών συστατικών με αποτέλεσμα την προτίμηση συνδυασμών μεθόδων με σκοπό τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης ποιοτικής πρωτεΐνης. Το ποσοστό ανάκτησης πρωτεϊνών ακόμη από μια μη ενζυματική μέθοδο είναι γνωστό πως είναι μικρότερο από το ποσοστό από μια μέθοδο στην οποία έγινε χρήση ενζύμου.

Οι φυσικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών μπορούν να αντιμετωπίσουν σε μεγάλο βαθμό τις επιπτώσεις που εμφανίζονταν στη τελική πρωτεΐνη λόγω των υψηλών ευαισθησιών αυτών στη θερμότητα και στους διαλύτες. Γίνεται χρήση καινοτόμων διαδικασιών όπως τα μικροκύματα, οι υπερήχοι κ.α. με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας του πορώδους του κυττάρου και της εισβολή του διαλύτη σε αυτό. Παρατηρείται και μείωση των μετουσιώσεων των πρωτεϊνών.

Με τις νέες μεθόδους που χρησιμοποιούνται μειώνονται οι διαλύτες, η θερμική υποβάθμιση και γίνεται εξοικονόμηση θερμότητας. Συγκεκριμένα η μέθοδος των μικροκυμάτων χαρακτηρίζεται καλύτερη άλλων συμβατικών μεθόδων όπως σε σύγκριση με τη συμβατική θερμική εκχύλιση λόγω της ομοειδούς θέρμανσης, του ενισχυμένου ρυθμού εκχύλισης, του μικρότερου διαλύτη κατανάλωσης και του λιγότερου χρόνου στον οποίο πραγματοποιείται η μέθοδος.

Η μέθοδος των υπερήχων σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση με αιθανόλη ή νερό έχει μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης των πρωτεϊνών για το

σκώληκα του αλεύρου. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες για τους υπερήχους είναι πιο αποτελεσματικές από αυτές των συμβατικών μεθόδων.

Η υποσχόμενη μέθοδος με τη βοήθεια παλμικού ηλεκτρικού πεδίου πλεονεκτεί σε σύγκριση με συμβατικές θερμικές μεθόδους όμως είναι αναποτελεσματική για την επίτευξη υψηλών ποσοστών ανάκτησης πρωτεϊνών έναντι σε άλλες μη συμβατικές μεθόδους. Χρησιμοποιείται καλύτερα ως προεπεξεργασία σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές.

Συμπεραίνεται επομένως πως η κατάλληλη επιλογή εναλλακτικής πηγής και μεθόδου για την απομόνωση πρωτεϊνών από αυτή είναι ένα πρόβλημα με αρκετές μεταβλητές στο οποίο κάθε φορά καλείται μία βιομηχανία που ασχολείται με τον τομέα, να δώσει τη βέλτιστη απάντηση. Η ενσωμάτωση των πράσινων τεχνικών στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί ανάγκη, με τη πάροδο του χρόνου και την αποδοχή από τους καταναλωτές να συμβάλλουν σε αυτή.

5. Βιβλιογραφικές Αναφορές

Akhtar, Y., & Isman, M. B. (2018). Insects as an Alternative Protein Source. In *Proteins in Food Processing: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00011-5>

Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., & Ohshima, T. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(13), 3790–3796. <https://doi.org/10.1021/jf0212385>

Alting, A. C., Pouvreau, L., Giuseppin, M. L. F., & van Nieuwenhuijzen, N. H. (2011). Potato proteins. In *Handbook of Food Proteins* (Vol. 2008). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.316>

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. dos R., Leite, M. de O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(12), 1976–2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>

Ashokkumar, M., Lee, J., Iida, Y., Yasui, K., Kozuka, T., Tuziuti, T., & Towata, A. (2010). Spatial distribution of acoustic cavitation bubbles at different ultrasound frequencies. *ChemPhysChem*, *11*(8), 1680–1684. <https://doi.org/10.1002/cphc.200901037>

Aydin, C. (2002). Physical properties of hazelnuts. *Biosystems Engineering*, *82*(3), 297–303. <https://doi.org/10.1006/bioe.2002.0065>

- Barakat, A., Jérôme, F., & Rouau, X. (2015). A dry platform for separation of proteins from biomass-containing polysaccharides, lignin, and polyphenols. *ChemSusChem*, 8(7), 1161–1166. <https://doi.org/10.1002/cssc.201403473>
- Barros de Medeiros, V. P., da Costa, W. K. A., da Silva, R. T., Pimentel, T. C., & Magnani, M. (2021). Microalgae as source of functional ingredients in new-generation foods: challenges, technological effects, biological activity, and regulatory issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879729>
- Bashi, Z., McCullough, R., Ong, L., & Ramirez, M. (2019). Alternative proteins: The race for market share is on. *McKinsey & Company - Agriculture Practice*, August, 1–11. <https://www.mckinsey.com/industries/agriculture/our-insights/alternative-proteins-the-race-for-market-share-is-on>
- Bilek, S. E. (2018). Plant Based Protein Sources and Extraction. *Current Investigations in Agriculture and Current Research*, 2(1), 169–171. <https://doi.org/10.32474/ciacr.2018.02.000130>
- Bose, U., Broadbent, J. A., Juhász, A., Karnaneedi, S., Johnston, E. B., Stockwell, S., Byrne, K., Limviphuvadh, V., Maurer-Stroh, S., Lopata, A. L., & Colgrave, M. L. (2021). Protein extraction protocols for optimal proteome measurement and arginine kinase quantitation from cricket *Acheta domesticus* for food safety assessment. *Food Chemistry*, 348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129110>
- Bouras, M., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2016). Impact of pulsed electric fields on polyphenols extraction from Norway spruce bark. *Industrial Crops and Products*, 80, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.051>
- Chakraborty, P., Mallik, A., Sarang, N., & Lingam, S. S. (2019). A review on alternative plant protein sources available for future sustainable aqua feed production. *International Journal of Chemical Studies*, 7(3), 1399–1404. https://www.researchgate.net/publication/334233293_A_review_on_alternative_plant_protein_sources_available_for_future_sustainable_aqua_feed_production
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Choi, B. D., Wong, N. A. K., & Auh, J. H. (2017). Defatting and sonication enhances protein extraction from edible insects. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(6), 955–961. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.6.955>

- Chow, C. Y., Riantiningtyas, R. R., Sørensen, H., & Bom Frøst, M. (2021). School children cooking and eating insects as part of a teaching program – Effects of cooking, insect type, tasting order and food neophobia on hedonic response. *Food Quality and Preference*, 87(July 2020), 104027. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104027>
- Cláudia da Costa Rocha, A., José de Andrade, C., & de Oliveira, D. (2021). Perspective on integrated biorefinery for valorization of biomass from the edible insect *Tenebrio molitor*. *Trends in Food Science and Technology*, 116(July), 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.012>
- Costa-Neto, E. M., & Dunkel, F. V. (2016). Insects as Food: History, Culture, and Modern Use around the World. In *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802856-8.00002-8>
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, 299(January), 125161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161>
- De Oliveira Sousa, A. G., Fernandes, D. C., Alves, A. M., de Freitas, J. B., & Naves, M. M. V. (2011). Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. *Food Research International*, 44(7), 2319–2325. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.013>
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1–60. <https://doi.org/10.3390/nu12071935>
- Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125(April), 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., & Pérez-Alvarez, J. A. (2021). Quinoa and chia products as ingredients for healthier processed meat products: technological strategies for their application and effects on the final product. *Current Opinion in Food Science*, 40, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.05.004>
- Figueira, N., Curtain, F., Beck, E., & Grafenauer, S. (2019). Consumer understanding and culinary use of legumes in Australia. *Nutrients*, 11(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu11071575>
- Forum, W. E. (2019). Meat: The Future Series - Alternative Proteins. *World*

- Economic Forum (WEF)*, January, 1–32.
http://www3.weforum.org/docs/WEF_White_Paper_Alternative_Proteins.pdf
- Gangopadhyay, N., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. P. (2015). A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules*, *20*(6), 10884–10909. <https://doi.org/10.3390/molecules200610884>
- Garcia-Segovia, P., Igual, M., & Martinez-Monzo, J. (2020). Physicochemical Properties and Consumer. *Foods*, *9*(933), 1–22.
- Gómez, B., Munekata, P. E. S., Zhu, Z., Barba, F. J., Toldrá, F., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., & Lorenzo, J. M. (2019). Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects. *Advances in Food and Nutrition Research*, *89*, 259–295. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.003>
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Bioresource Technology Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp . using different methods of cell disruption. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, *153*, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.011>
- Grundy, M. M. L., Lapsley, K., & Ellis, P. R. (2016). A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(9), 1937–1946. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13192>
- Gu, X., Gao, T., Hou, Y., Li, D., & Fu, L. (2020). Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory peptides from almond (*Armeniaca sibirica*) oil manufacture residue. *Lwt*, *134*(666). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110215>
- Hashempour-Baltork, F., Khosravi-Darani, K., Hosseini, H., Farshi, P., & Reihani, S. F. S. (2020). Mycoproteins as safe meat substitutes. *Journal of Cleaner Production*, *253*, 119958. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119958>
- Hawkey, K. J., Lopez-Viso, C., Brameld, J. M., Parr, T., & Salter, A. M. (2021). Insects: A Potential Source of Protein and Other Nutrients for Feed and Food. *Annual Review of Animal Biosciences*, *9*, 333–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083930>
- Hertzler, S. R., Lieblein-Boff, J. C., Weiler, M., & Allgeier, C. (2020). Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. *Nutrients*, *12*(12), 1–27. <https://doi.org/10.3390/nu12123704>
- Hoek, A. C., Luning, P. A., Weijzen, P., Engels, W., Kok, F. J., & de Graaf, C. (2011). Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person- and product-related factors in consumer acceptance. *Appetite*, *56*(3), 662–673. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.02.001>

- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. P. D. (2017). Rice Protein and Rice Protein Products. In *Sustainable Protein Sources*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00003-2>
- Hou, J., He, S., Ling, M., Li, W., Dong, R., Pan, Y., & Zheng, Y. (2010). A method of extracting ginsenosides from Panax ginseng by pulsed electric field. *Journal of Separation Science*, 33(17–18), 2707–2713. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000033>
- House, J. (2016). Consumer acceptance of insect-based foods in the Netherlands: Academic and commercial implications. *Appetite*, 107(September 2015), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.07.023>
- Inês, K., Moro, B., Betine, A., Bender, B., Picolli, L., & Garcia, N. (2021). Green Extraction Methods and Microencapsulation Technologies of Phenolic Compounds From Grape Pomace : A Review. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02665-4>
- Jiménez-Munoz, L. M., Tavares, G. M., & Corredig, M. (2021). Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 113(September 2020), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.049>
- Kala, B. K., & Mohan, V. R. (2012). Effect of microwave treatment on the antinutritional factors of two accessions of velvet bean, *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. Utilis (wall. Ex wight) bak. Ex burck. *International Food Research Journal*, 19(3), 961–969.
- Kärenlampi, S. O., & White, P. J. (2009). Potato Proteins, Lipids, and Minerals. *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 99–125. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374349-7.00005-2>
- Khan, S. A., Aslam, R., & Makroo, H. A. (2019). High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12896>
- Killeit, U. (2019). The chemical composition and nutritional value of chia seeds – current state of knowledge. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 115(9), 1–16.
- Klose, C., & Arendt, E. K. (2012). Proteins in Oats; their Synthesis and Changes during Germination: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(7), 629–639. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.504902>
- Kratzer, R., & Murkovic, M. (2021). Food ingredients and nutraceuticals from microalgae: Main product classes and biotechnological production. *Foods*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/foods10071626>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M. K., Satankar, V., Bhoite, A.

- G., Amarowicz, R., Kaur, C., & Kennedy, J. F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115(December 2020), 106595. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>
- Landeta-Salgado, C., Cicatiello, P., & Lienqueo, M. E. (2021). Mycoprotein and hydrophobin like protein produced from marine fungi *Paradendryphiella salina* in submerged fermentation with green seaweed *Ulva* spp. *Algal Research*, 56(April), 102314. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102314>
- Lazou, A., Krokida, M., & Tzia, C. (2010). Sensory properties and acceptability of corn and lentil extruded puffs. *Journal of Sensory Studies*, 25(6), 838–860. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2010.00308.x>
- Lee, J. H., Kim, T. K., Jeong, C. H., Yong, H. I., Cha, J. Y., Kim, B. K., & Choi, Y. S. (2021). Biological activity and processing technologies of edible insects: a review. *Food Science and Biotechnology*, 30(8), 1003–1023. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00942-8>
- 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*, 124, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.009>
- Linder, T. (2019). Making the case for edible microorganisms as an integral part of a more sustainable and resilient food production system. *Food Security*, 11(2), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s12571-019-00912-3>
- Lippolis, A., Bussotti, L., Ciani, M., Fava, F., Niccolai, A., Rodolfi, L., Tredici, M. R., Lippolis, A., Bussotti, L., Ciani, M., Fava, F., & Niccolai, A. (2019). *Microbes : Food for the Future Microbes : Food for the Future*. June, 13–14.
- Lombardi, A., Vecchio, R., Borrello, M., Caracciolo, F., & Cembalo, L. (2019). Willingness to pay for insect-based food: The role of information and carrier. *Food Quality and Preference*, 72, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.10.001>
- Lu, W., Chen, X. W., Wang, J. M., Yang, X. Q., & Qi, J. R. (2016). Enzyme-assisted subcritical water extraction and characterization of soy protein from heat-denatured meal. *Journal of Food Engineering*, 169, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.006>
- Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., & Verstraete, W. (2016). Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 568–575. <https://doi.org/10.1111/1751->

7915.12369

- Maurya, N. K., & Kushwaha, R. (2019). *Novel Protein Foods : Alternative Sources of Protein for Human Consumption Chapter - 7 Novel Protein Foods : Alternative Sources of Protein for Human Consumption Authors Institute of Home Science , Bundelkhand University , Jhansi , Uttar. June.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.3249792>
- Millar, K. A., Barry-Ryan, C., Burke, R., McCarthy, S., & Gallagher, E. (2019). Dough properties and baking characteristics of white bread, as affected by addition of raw, germinated and toasted pea flour. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56(July), 102189. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102189>
- Mistry, M., George, A., & Thomas, S. (2020). Alternatives to meat for halting the stable to table continuum—an update. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 27(1), 324–334. <https://doi.org/10.1080/25765299.2020.1807084>
- Mofasser Hossain, A. K. M., Brennan, M. A., Mason, S. L., Guo, X., Zeng, X. A., & Brennan, C. S. (2017). The effect of astaxanthin-rich microalgae “haematococcus pluvialis” and wholemeal flours incorporation in improving the physical and functional properties of cookies. *Foods*, 6(8), 1–10. <https://doi.org/10.3390/foods6080057>
- Mondor, M., & Lalanne, G. M. (2021). Drying technologies for edible insects and their derived ingredients. *Drying Technology*, 0(0), 1–19. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1915796>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29(4), 394–408. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818014>
- Mushtaq, A., Gul-Zaffar, ., Z., A. D., & Mehfuza, H. (2014). A review on Oat (*Avena sativa* L.) as a dual-purpose crop. *Scientific Research and Essays*, 9(4), 52–59. <https://doi.org/10.5897/sre2014.5820>
- Navruz-Varli, S., & Sanlier, N. (2016). Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Cereal Science*, 69, 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.05.004>
- 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*, 10(3), 543–555. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1838-3>
- Ojha, S., Bußler, S., Psarianos, M., Rossi, G., & Schlüter, O. K. (2021). *Abstract*. 7(5), 877–900. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0121>
- Onwezen, M. C., Bouwman, E. P., Reinders, M. J., & Dagevos, H. (2021). A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins:

- Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. *Appetite*, 159, 105058. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105058>
- Orkusz, A. (2021). Edible insects versus meat—nutritional comparison: Knowledge of their composition is the key to good health. *Nutrients*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/nu13041207>
- Pal, P., & Roy, S. (2014). Edible Insects: Future of Human Food - A Review. *International Letters of Natural Sciences*, 26, 1–11. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.26.1>
- Patil, P. D., Patil, S. P., Kelkar, R. K., Patil, N. P., Pise, P. V., & Nadar, S. S. (2021). Trends in Food Science & Technology Enzyme-assisted supercritical fluid extraction : An integral approach to extract bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 116(July), 357–369. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.032>
- Phongthai, S., Lim, S. T., & Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, 70, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.001>
- Picot-allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). ScienceDirect Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>
- Pojčić, 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 and Technology*, 75(October 2017), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>
- Postma, P. R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., Olivieri, G., & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field-temperature treatment. *Bioresource Technology*, 203, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.012>
- Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (2019). Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Extraction Conditions Affect Extraction Yield and Protein Quality. *Journal of Food Science*, 84(12), 3682–3690. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14850>
- Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P. J., & Zuidam, N. J. (2017). Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 113, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.003>
- 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*, 63(11), 2997–

3003. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01077>

- 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*, *62*(32), 7989–7997. <https://doi.org/10.1021/jf501802e>
- Saadaoui, I., Rasheed, R., Aguilar, A., Cherif, M., Al Jabri, H., Sayadi, S., & Manning, S. R. (2021). Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00593-z>
- Safi, C., Rodriguez, L. C., Mulder, W. J., Spekking, W., Broek, L. A. M. Van Den, Olivieri, G., & Sijtsma, L. (2017). Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.012>
- Salgado, P. R., Drago, S. R., Molina Ortiz, S. E., Petrucelli, S., Andrich, O., González, R. J., & Mauri, A. N. (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Science and Technology*, *45*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.021>
- Sandberg, A. S. (2011). Developing functional ingredients: a case study of pea protein. In *Functional Foods: Concept to Product: Second Edition*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857092557.3.358>
- Sari, Y. W., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. M. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, *43*(1), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.014>
- Sogari, G., Menozzi, D., & Mora, C. (2017). Exploring young foodies' knowledge and attitude regarding entomophagy: A qualitative study in Italy. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *7*(June 2016), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.12.002>
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, *36*(October), 175–192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Sozer, N., Nordlund, E., Ercili-Cura, D., & Poutanen, K. (2017). Cereal side-streams as alternative protein sources. *Cereal Foods World*, *62*(4), 132–137. <https://doi.org/10.1094/CFW-62-4-0132>
- Taneja, S., Guo, Y., Slaven, M., & Lalani, A. (2021). Cite as: Taneja S, Guo Y, Slaven M, et al. *The perceptions and beliefs of cannabis use among Canadian genitourinary cancer patients*.

- Tarté, R. (2009). Ingredients in meat products: Properties, functionality and applications. *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*, 1–419. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-71327-4>
- Till, B. E., Huntington, J. A., Posri, W., Early, R., Taylor-Pickard, J., & Sinclair, L. A. (2019). Influence of rate of inclusion of microalgae on the sensory characteristics and fatty acid composition of cheese and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *102*(12), 10934–10946. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16391>
- Timira, V., Meki, K., Li, Z., Lin, H., Xu, M., & Pramod, S. N. (2021). A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for proteins release from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1873734>
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y. C., Asavajaru, P., & Lam, A. (2016). Pea: A Sustainable Vegetable Protein Crop. In *Sustainable Protein Sources*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00009-3>
- Ullah, R., Nadeem, M., Khaliq, A., Imran, M., Mehmood, S., Javid, A., & Hussain, J. (2016). Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(4), 1750–1758. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1967-0>
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2019). Effect of microalgae addition on mineral content, colour and mechanical properties of breadsticks. *Food and Function*, *10*(8), 4685–4692. <https://doi.org/10.1039/c9fo00286c>
- van der Weele, C., Feindt, P., Jan van der Goot, A., van Mierlo, B., & van Boekel, M. (2019). Meat alternatives: an integrative comparison. *Trends in Food Science and Technology*, *88*(April), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.018>
- Van Huis, A., & Dunkel, F. V. (2017). Edible Insects: A Neglected and Promising Food Source. In *Sustainable Protein Sources*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00021-4>
- Van Huis, Arnold. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, *58*, 563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>
- Van Huis, Arnold. (2016). Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(3), 294–305. <https://doi.org/10.1017/S0029665116000069>
- Whitmore, J. (2019). The future of food: Meatless? *The Future of Food: Meatless?*, October, 21.
- Woolf, E., Zhu, Y., Emory, K., Zhao, J., & Liu, C. (2019). Willingness to consume insect-containing foods: A survey in the United States. *Lwt*,

- 102(December 2018), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.010>
- Wu, S. Y., Yeh, N. H., Chang, H. Y., Wang, C. F., Hung, S. Y., Wu, S. J., & Pan, W. H. (2021). Adequate protein intake in older adults in the context of frailty: cross-sectional results of the Nutrition and Health Survey in Taiwan 2014-2017. *American Journal of Clinical Nutrition*, 114(2), 649–660. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab070>
- Xiang, Y., Xiang, Y., & Wang, L. (2017). Kinetics of activated sludge protein extraction by thermal alkaline treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(6), 5352–5357. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.062>
- Xu, K., Wang, Y., Huang, Y., Li, N., & Wen, Q. (2014). A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta*, 864, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.026>
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., Zhou, C., Wang, Y., Mao, L., Zhang, Y., Ma, H., & Ye, X. (2017). Effects of multi-frequency ultrasound pretreatment under low power density on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001>
- Yen, A. L. (2015). Insects as food and feed in the Asia Pacific region: Current perspectives and future directions. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(1), 33–55. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0017>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Σφλώμος, Κωνσταντίνος (2018). Βιολειτουργικά Τρόφιμα Πρόσθετα & Συμπληρώματα Διατροφής, Εκδόσεις ΝΟΤΑ, 5(5.1), 109. ISBN:978-618-83264-6-0