



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Συγκομιδή μικροαλγών με χρήση μαγνητικών σωματιδίων και εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα



Διπλωματική Εργασία του Λογοθέτη Δημήτρη

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαγουλάς Κωνσταντίνος

Αθήνα, Φεβρουάριος 2016

Σε όλα εκείνα τα πρόσωπα που πίστεψαν σε εμένα
και με στήριξαν...

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Με την ολοκλήρωση της Διπλωματικής μου εργασίας ολοκληρώνονται οι προπτυχιακές σπουδές μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Θα ήθελα λοιπόν, με αυτή την αφορμή, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που στάθηκαν δίπλα μου στην περάτωση αυτή της Διπλωματικής Εργασίας.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή, κο Μαγουλά Κωνσταντίνο, για το θέμα που μου εμπιστεύτηκε, τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτή. Η προσφορά των επιστημονικών του γνώσεων και η στήριξή του ήταν πολύτιμη.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Σαββίδου Μαρία για την καλλιέργεια μικροαλγών που με προμήθευε. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα κα. Ντζιούνη Αφροδίτη για τη συνεργασία που είχαμε στο κομμάτι της σύνθεσης μαγνητικών σωματιδίων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου ξεχωριστά για όλα αυτά που μου προσέφεραν, από επιστημονικές γνώσεις έως και συμβουλές για ένα καλύτερο αποτέλεσμα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Μπόλη Ελενίτσα για τη βοήθεια που μου παρείχε και την υπομονή που έκανε μαζί μου καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, αλλά και το χρόνο που αφιέρωσε για την κριτική ανάγνωση της εργασίας και τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στους γονείς μου, Κώστα και Μαρία, και στον αδερφό μου Ανδρέα που με στήριξαν και με στηρίζουν σε κάθε μου προσπάθεια και μου δείχνουν την αμέριστη αγάπη τους.

Λογοθέτης Δημήτρης,

Αθήνα, Φεβρουάριος 2016

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσης διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της συγκομιδής βιομάζας μικροαλγών *Nannochloropsis oceanica* με χρήση μαγνητικών σωματιδίων και η εκχύλιση των ενδοκυτταρικών τους προϊόντων με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

Τα μικροάλγη είναι μικροοργανισμοί που συγκεντρώνουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στις μέρες μας λόγω των ενδοκυτταρικών τους προϊόντων και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας, συμπληρωμάτων διατροφής, καλλυντικών κ.ά. Εξαιτίας της πολύ χαμηλής τους συγκέντρωσης, η επεξεργασία τους για την περεταίρω εκμετάλλευσή τους καθίσταται ιδιαίτερα απαιτητική.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, αναπτύχθηκε μία μέθοδος μαγνητικού διαχωρισμού για την συγκομιδή της βιομάζας των μικροαλγών με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Επίσης, εξετάστηκε η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών με εκτόνωση από υψηλή πίεση με χρήση υπερκρίσιμου CO₂, και εφαρμόστηκε η μέθοδος Folch για τον προσδιορισμό του λιπιδικού τους περιεχομένου. Ακόμη, μελετήθηκε η υπερκρίσιμη εκχύλιση βιομάζας που προηγουμένως έχει υποστεί εκτόνωση από υψηλή πίεση, και προσδιορίστηκε η απόδοση της εκχύλισης.

Εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της συγκομιδής των μικροαλγών μεταξύ των οποίων η επίδραση του pH, της αναλογίας μαγνητικών σωματιδίων, του χρόνου μαγνήτισης, του ρυθμού και του χρόνου ανάδευσης στη συγκομιδή του είδους *Nannochloropsis oceanica*. Η πειραματική μελέτη έδειξε ότι για pH= 10, ανάδευση 10 λεπτών στις 250 στροφές και διπλάσια μάζα μαγνητικών σωματιδίων σε σχέση με αυτή της βιομάζας, επετεύχθη απόδοση της τάξης του 99%. Όσο αφορά τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των μικροαλγών, η εκτόνωση από υψηλή πίεση αποδείχθηκε πως αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης των ενδοκυτταρικών προϊόντων. Τέλος, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO₂ στους 40 °C και στα 250 bar οδήγησε σε απόδοση της τάξης του 37% του συνολικού λιπιδικού περιεχομένου. Αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης είναι δυνατή με αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης εκχύλισης αλλά και με τη χρήση συνδιαλύτη.

Λέξεις κλειδιά: Μικροάλγη, συγκομιδή, κυτταρική διάρρηξη, υπερκρίσιμη εκχύλιση

Abstract

The aim of this diploma thesis was the harvesting of microalgae biomass of *Nannochloropsis oceanica* by using magnetic particles and the supercritical extraction of their intracellular products with carbon dioxide.

Microalgae are microorganisms, which gather great interest nowadays because of their intracellular products and are used for energy production, food supplements, cosmetics etc. Due to their very low concentration, process becomes very demanding and time consuming.

In the context of this work, a magnetic separation method for the harvesting of microalgae biomass by applying an external magnetic field was developed. The cell disruption was also studied by applying supercritical CO₂ of high pressure, and the Folch method was used in order to determine the lipid content. Furthermore, the supercritical extraction of pretreated biomass was examined and the efficiency of extraction was determined.

As far as magnetic separation is concerned, the influence of pH, mass ratio of magnetic particles, the magnetization time, stirring speed and stirring time in the magnetic separation of *Nannochloropsis oceanica* were examined. Experimental study showed that pH = 10, 10 minutes stirring at 250 rpm and 2:1 ratio of magnetic particles to biomass, led to 99% efficiency. In addition, cell disruption by application of high pressure proved that it had increased the efficiency of the extraction of intracellular products. Finally, supercritical extraction by CO₂ at 40 ° C and 250 bar led to the extraction of 37% of the total lipid content. More severe extraction conditions (higher T and P) as well as the use of co-solvent would possibly improve the efficiency.

Key words: microalgae, harvesting, cell disruption, supercritical extraction

Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή.....	1
2	Μικροάλγη.....	3
2.1.1	Χρήσεις μικροαλγών.....	5
2.1.2	Επεξεργασία μικροαλγών σε μεγάλη κλίμακα.....	7
3	Μέθοδοι Συγκομιδής.....	9
3.1	Εισαγωγή.....	9
3.1.1	Φυγοκέντρηση (Centrifugation).....	10
3.1.2	Καθίζηση λόγω βαρύτητας (Gravity sedimentation).....	11
3.1.3	Διήθηση και κοσκίνισμα (Filtration and screening).....	12
3.1.4	Κροκίδωση (Flocculation).....	13
3.1.5	Επίπλευση (Flotation).....	14
3.1.5.1	Επίπλευση με διαλυμένο αέρα (Dissolved air flotation).....	15
3.1.5.2	Επίπλευση με διεσπαρμένο αέρα (Dispersed air flotation).....	15
3.1.6	Ηλεκτροφόρηση.....	15
3.1.6.1	Ηλεκτρολυτική πήξη.....	16
3.1.6.2	Ηλεκτρολυτική επίπλευση.....	16
3.1.6.3	Ηλεκτρολυτική κροκίδωση.....	16
3.1.7	Μαγνητικός διαχωρισμός.....	17
3.2	Σύνοψη μεθόδων συγκομιδής.....	17
4	Συγκομιδή μικροαλγών με χρήση μαγνητικών σωματιδίων.....	19
4.1	Μαγνητικά σωματίδια.....	19
4.2	Σύνθεση μαγνητικών σωματιδίων.....	19
4.3	Χαρακτηριστικά μαγνητικών σωματιδίων.....	20
4.4	Πιθανοί μηχανισμοί πρόσδεσης μαγνητικών σωματιδίων- μικροαλγών.....	21
4.5	Ανάκτηση κυττάρων και ανακύκλωση σωματιδίων.....	22
5	Μέθοδοι διάρρηξης κυττάρων.....	24
5.1	Εισαγωγή.....	24
5.2	Μέθοδοι.....	25
5.2.1	Μηχανικές μέθοδοι.....	25
5.2.1.1	Μικροκύματα.....	25
5.2.1.2	Επεξεργασία με υπερήχους.....	26

5.2.1.3	Επεξεργασία με σφαιρόμυλο.....	26
5.2.1.4	Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις.....	27
5.2.1.5	Ηλεκτρομετασχηματισμός.....	28
5.2.1.6	Κατάψυξη.....	28
5.2.1.7	Υπερκρίσιμα ρευστά.....	29
5.2.1.8	Χημικές μέθοδοι.....	29
5.2.1.9	Χρήση χημικών ουσιών.....	29
5.2.1.10	Ωσμωτικό σοκ.....	29
5.2.1.11	Βιολογικές μέθοδοι.....	30
5.3	Σύνοψη μεθόδων διάρρηξης κυττάρου.....	31
6	<i>Μέθοδοι εξαγωγής ενδοκυτταρικών προϊόντων.....</i>	<i>32</i>
6.1	Οργανικοί διαλύτες.....	32
6.2	Υπερκρίσιμη εκχύλιση.....	34
6.3	Σύγκριση μεταξύ οργανικών διαλυτών και υπερκρίσιμου SCCO ₂	39
7	<i>Πειραματικές διατάξεις.....</i>	<i>40</i>
7.1	Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE-500.....	40
7.2	Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SPA.....	42
7.3	Μετρήσεις δυναμικού Zeta και διαμέτρου σωματιδίων.....	44
7.3.1	Οργανολογία μέτρησης μεγέθους σωματιδίων.....	44
7.3.2	Οργανολογία μέτρησης δυναμικού Z (zeta potential).....	45
7.4	Φασματόμετρο UV-Vis (BOECO MODEL S-20).....	47
8	<i>Πειραματική διαδικασία.....</i>	<i>49</i>
8.1	Μικροοργανισμός.....	49
8.1.1	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του μικροάλγους <i>Nannochloropsis oceanica</i>	49
8.1.2	Συνθήκες καλλιέργειας.....	49
8.2	Παρασκευή μαγνητικών σωματιδίων.....	50
8.3	Μετρήσεις δυναμικού Zeta και διαμέτρου σωματιδίων.....	51
8.4	Συγκομιδή μικροαλγών.....	51
8.5	Διάρρηξη κυττάρων με υπερκρίσιμο CO ₂	53
8.6	Μέθοδος Folch.....	54
8.7	Υπερκρίσιμη εκχύλιση.....	54
9	<i>Αποτελέσματα- σχολιασμός.....</i>	<i>56</i>

9.1	Μετρήσεις δυναμικού zeta και διαμέτρου κυττάρων και μαγνητικών σωματιδίων.....	56
9.2	Συγκομιδή βιομάζας	58
9.2.1	Προκαταρκτικός πειραματικός σχεδιασμός	58
9.2.1.1	Επίδραση αριθμού στροφών	59
9.2.1.2	Επίδραση χρόνου ανάδευσης	59
9.2.1.3	Επίδραση pH στην απόδοση του διαχωρισμού	60
9.2.1.4	Επίδραση αναλογίας μαζών σωματιδίων προς μάζα κυττάρων βιομάζας για σταθερή τιμή pH.....	61
9.2.1.5	Επίδραση χρόνου ανάδευσης, αριθμού στροφών, αναλογίας μαζών για σταθερές τιμές pH.....	62
9.2.1.6	Επίδραση χρόνου ανάδευσης και αριθμού στροφών για σταθερό pH και αναλογία μαζών	64
9.2.1.7	Σχολιασμός προκαταρκτικής μελέτης	65
9.2.2	Επίδραση αναλογίας μαζών και pH	66
9.2.2.1	Αναλογία μαζών για σταθερή τιμή pH	67
9.2.2.2	Επίδραση pH.....	69
9.2.2.3	Σχολιασμός αποτελεσμάτων	70
9.3	Πιθανός μηχανισμός σύνδεσης σωματιδίων και κυττάρων.....	70
9.4	Συγκομιδή ελλείψει ενός θρεπτικού συστατικού	71
9.4.1	Σχολιασμός αποτελεσμάτων	72
9.5	Διάρρηξη κυττάρων με υπερκρίσιμο CO ₂	73
9.5.1	Σχολιασμός αποτελεσμάτων	73
9.6	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα	74
9.6.1	Σχολιασμός αποτελεσμάτων	75
10	<i>Συμπεράσματα- Προτάσεις</i>	76
11	<i>Βιβλιογραφία</i>	77

Λίστα πινάκων

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων συγκομιδής.	18
Πίνακας 2. Μέθοδοι συγκομιδής που εφαρμόστηκαν σε είδη του μικροάλγους Nannochloropsis.	18
Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων διάρρηξης κυττάρων.	31
Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά μεγέθη της μονάδας υπερκρίσιμης εκχύλισης.	41
Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά λειτουργίας συσκευής SPA.	44
Πίνακας 6. Πειραματικές μετρήσεις για τις οποίες εξετάστηκε η μεταβολή της απόδοσης συναρτήσει της τιμής του pH και m_R	66
Πίνακας 7. Πειραματικά αποτελέσματα συγκομιδής ελλείπει ενός θρεπτικού συστατικού.	71
Πίνακας 8. Πειραματικά αποτελέσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης.	74
Πίνακας 9. Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης με μέθοδο Folch.	75

Λίστα εικόνων

Εικόνα 1. Απόδοση σε έλαια μικροαλγών και διαφόρων χερσαίων φυτών.	5
Εικόνα 2. Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης βιομάζας και τιμής τελικού προϊόντος για τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας.	8
Εικόνα 3. Διαχωριστήρας τύπου Lamella.	11
Εικόνα 4. Δεξαμενή καθίζησης.	12
Εικόνα 5. Είδη φίλτρων.	13
Εικόνα 6. Κροκίδωση μικροαλγών.	14
Εικόνα 7. Μαγνητικός διαχωρισμός μικροαλγών.	17
Εικόνα 8. Μηχανισμός εξουδετέρωσης φορτίου.	21
Εικόνα 9. Μηχανισμός γεφύρωσης.	22
Εικόνα 10. Ενδεικτικό σχεδιάγραμμα σφαιρόμυλου.	27
Εικόνα 11. Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις.	28
Εικόνα 12. Συσκευή <i>Separex SFE 500</i>	40
Εικόνα 13. Συσκευή SPA.	43
Εικόνα 14. Φασματόμετρο Boeco Model S-20.	48
Εικόνα 15. Αρχική ποσότητα βιομάζας.	53
Εικόνα 16. Ποσότητα καλλιέργειας και μαγνητικών σωματιδίων στη φάση του μαγνητικού διαχωρισμού (0-5 sec).	53

Λίστα σχημάτων

Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση επεξεργασίας μικροαλγών.	9
Σχήμα 2. Σχηματικό διάγραμμα των μηχανισμών δράσης του οργανικού διαλύτη.	33
Σχήμα 3. Διάγραμμα φάσεων P-T για το διοξείδιο του άνθρακα.	34
Σχήμα 4. Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού υπερκρίσιμης εκχύλισης.	35
Σχήμα 5. Διάταξη συσκευής μέτρησης.	45
Σχήμα 6. Διάταξη συσκευής μέτρησης.	47

Λίστα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Σύσταση εκχυλισμένων λιπαρών οξέων του μικροάλγους <i>Nannochloropsis</i> sp μετά από εκχύλιση με Soxhlet και CO ₂ .	35
Διάγραμμα 2. Επίπτωση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO ₂ σε <i>Scenedesmus</i> sp.	36
Διάγραμμα 3. Επίπτωση της πίεσης εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO ₂ σε <i>Scenedesmus</i> sp.	36
Διάγραμμα 4. Επιπτώσεις της προεπεξεργασίας της βιομάζας (<i>Scenedesmus</i> sp.) στην απόδοση της εκχύλισης	37
Διάγραμμα 5. Βιβλιογραφικά πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης λιπιδίων από το στέλεχος <i>Nannochloropsis</i> sp. για τις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες	38
Διάγραμμα 6. Βιβλιογραφικά πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης χρωστικών από το στέλεχος <i>Nannochloropsis</i> sp. για τις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες	38
Διάγραμμα 7. Διάγραμμα ροής εργαστηριακής συσκευής (SFE-500).	42
Διάγραμμα 8. Διάγραμμα ροής συσκευής SPA	43
Διάγραμμα 9. Συμπεριφορά zeta δυναμικού μαγνητικών σωματιδίων και <i>Nannochloropsis oceanica</i> , κατά τη μεταβολή του pH.	56
Διάγραμμα 10. Κατανομή μεγέθους μαγνητικών σωματιδίων.	57
Διάγραμμα 11. Κατανομή μεγέθους κυττάρων βιομάζας.	57
Διάγραμμα 12. Επίδραση ρυθμού ανάδευσης στην απόδοση διαχωρισμού για pH=10, χρόνος ανάδευσης 10 min και m _R =10.	59
Διάγραμμα 13. Επίδραση χρόνου ανάδευσης στην απόδοση διαχωρισμού για σταθερές τιμές pH=10, αριθμό περιστροφών 250 rpm και m _R =10.	60
Διάγραμμα 14. Επίδραση τιμής pH στην απόδοση του διαχωρισμού για σταθερές τιμές ρυθμού περιστροφής ίσο με 250 rpm, 10 λεπτών ανάδευσης και m _R =10.	61
Διάγραμμα 15. Επίδραση αναλογίας μαζών στην απόδοση του διαχωρισμού για pH=10, 250 rpm και 10 min ανάδευσης.	62
Διάγραμμα 16. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών, του αριθμού στροφών και του χρόνου ανάδευσης για pH=6.	62
Διάγραμμα 17. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών, του αριθμού στροφών και του χρόνου ανάδευσης για pH=10.	63
Διάγραμμα 18. Απόδοση μαγνητικού διαχωρισμού συναρτήσει αριθμού στροφών για χρόνους ανάδευσης 5 και 10 λεπτών, pH=8 και αναλογία μαζών 7.	64
Διάγραμμα 19. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=4.	67
Διάγραμμα 20. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=6.	67
Διάγραμμα 21. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=8.	68
Διάγραμμα 22. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=10.	68
Διάγραμμα 23. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει του pH, για διάφορες αναλογίες μαζών.	69
Διάγραμμα 24. Απόδοση μαγνητικού διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών.	72
Διάγραμμα 25. Λιπιδικό περιεχόμενο του μικροάλγους <i>Nannochloropsis oceanica</i> συναρτήσει συνθηκών κυτταρικής διάρρηξης.	73
Διάγραμμα 26. Πειραματικά αποτελέσματα μεταβολής μάζας της βιομάζας συναρτήσει της ποσότητας του διαλύτη	74

1 Εισαγωγή

Οι αναδυόμενες οικονομίες και ο συνεχώς αυξανόμενος πληθυσμός της Γης, βασίζονται εξολοκλήρου στην ύπαρξη και εκμετάλλευση των φυσικών πόρων του πλανήτη. Η συνεχόμενη αύξηση του πληθυσμού σε λίγα χρόνια θα προξενήσει πολύ μεγάλη ανάγκη για πρώτες ύλες. Με τον αριθμό των καλλιεργήσιμων εκτάσεων που υπάρχουν, να φαίνεται πολύ μικρός για να καλύψει τις απαιτήσεις του πληθυσμού, το μόνο σίγουρο είναι ότι οι φυσικοί πόροι θα αποτελέσουν είδος προς εξαφάνιση. Δεδομένης της κατασπατάλησης των αποθεμάτων πετρελαίου, της αναποτελεσματικής διαχείρισης των υγρών αποβλήτων και της αυξανόμενης ατμοσφαιρικής ρύπανσης, ο πλανήτης Γη έχει αρχίσει να εκπέμπει σήματα κινδύνου προς κάθε κατεύθυνση. Ποτέ έως τώρα η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας αειφόρου κοινωνίας δεν ήταν μεγαλύτερη από ότι στον αιώνα που διανύουμε. Η εύρεση μεθόδων παραγωγής ενέργειας και τροφής που θα είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον και θα εξοικονομούν τα ήδη περιορισμένα αποθέματα πρώτων υλών του πλανήτη, είναι μείζονος σημασίας.

Σημαντικός υποστηρικτής σε αυτή την προσπάθεια φαίνεται πως είναι τα μικροάλγη, η παραγωγή των οποίων ξεκίνησε στα μέσα του περασμένου αιώνα. Στην αρχή, τα μικροάλγη χρησιμοποιούνταν στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων και των αστικών λυμάτων. Κατά τη διάρκεια των πετρελαϊκών κρίσεων της δεκαετίας του '70, εντάθηκε το ενδιαφέρον για την εκμετάλλευσή τους στην παραγωγή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας [1].

Σήμερα τα οφέλη που παρουσιάζει η χρήση των μικροαλγών είναι πολλά και για τον λόγο αυτό έχει επεκταθεί σε διάφορους τομείς των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων και αναγκών, όπως είναι η παραγωγή βιοντίζελ, συμπληρωμάτων διατροφής, προϊόντων καλλωπισμού κ.ά.

Στη διαδικασία παραγωγής, συλλογής και αξιοποίησης της βιομάζας από καλλιέργειες μικροαλγών ένα από τα δυσκολότερα και πλέον ακριβά στάδια αποτελεί η συγκομιδή της βιομάζας των μικροαλγών. Στον τομέα αυτό έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος, ωστόσο καμία μέθοδος από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται δεν μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική λόγω του υψηλού κόστους λειτουργίας και του χρόνου που απαιτείται.

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας αποδοτικής και επαρκούς μεθόδου συγκομιδής μικροαλγών του είδους *Nannochloropsis oceanica* με χρήση χαμηλού κόστους παρασκευής μαγνητικών σωματιδίων Fe_3O_4 .

Οι λειτουργικές παράμετροι της συγκομιδής που εξετάζονται είναι το pH, η αναλογία μαζών βιομάζας και μαγνητικών σωματιδίων, ο ρυθμός και ο χρόνος ανάδευσης ενώ γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού του πιθανού μηχανισμού πρόσδεσης των σωματιδίων και της βιομάζας.

Τέλος, εξετάζεται η χρήση υπερκρίσιμου CO₂ τόσο για τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης όσο και για την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών της βιομάζας των μικροαλγών..

Στο επόμενο κεφάλαιο της διπλωματικής αναπτύσσονται οι ιδιότητες και χρήσεις των μικροαλγών, ενώ στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι συγκομιδής της βιομάζας των μικροαλγών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Ακολούθως, στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται η χρήση μαγνητικών σωματιδίων για τη συγκομιδή μικροαλγών, οι μέθοδοι σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων αυτών, οι πιθανοί μηχανισμοί σύνδεσης με τα κύτταρα της βιομάζας και οι τρόποι ανάκτησης των σωματιδίων και της βιομάζας μετά τη συγκομιδή. Στο πέμπτο κεφάλαιο, αναπτύσσονται οι μέθοδοι διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης των μικροαλγών και στο έκτο, οι μέθοδοι εξαγωγής των ενδοκυτταρικών τους προϊόντων. Στα επόμενα τρία κεφάλαια, περιγράφονται οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν, η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε και τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν. Τέλος, στο δέκατο κεφάλαιο παρατίθενται τα συμπεράσματα από την πειραματική έρευνα.

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος (Κωδικός έργου: 11SYN_4_1590) που χρηματοδοτήθηκε από το έργο «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011 - Συμπράξεις Παραγωγικών και Ερευνητικών Φορέων σε εστιασμένους Ερευνητικούς και Τεχνολογικούς τομείς» που υλοποιείται στα πλαίσια του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.

Μέρος της διπλωματικής εργασίας αναρτήθηκε σε poster: E. Boli, M. Savvidou, D. Logothetis, Th. Lympferopoulou, K. Balta-Brouma, G. Pappa, V. Louli, E. Voutsas, K. Magoulas, F. Kolisis, "*Investigation of parameters affecting the harvesting and extraction of Nannochloropsis sp.*" 28th ESAT-Athens, June 2015.

2 Μικροάλγη

Τα μικροάλγη είναι προκαρυωτικοί ή ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν γρήγορα ακόμη και στις πιο αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 1 έως 50 μm. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα γενετικής ποικιλομορφίας που μπορεί να επιβιώσει σε ένα πολύ μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών. Είναι παρόντα σε όλα τα υπάρχοντα οικοσυστήματα του πλανήτη, όχι μόνο στα υδατικά αλλά και στα χερσαία, και συνθέτουν τη βάση για τα περισσότερα είδη τροφικών αλυσίδων. Συνήθως τα μικροάλγη δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι, αλλά εάν αναπτυχθούν σε ευτροφικό νερό, το νερό θολώνει και παίρνει το χρώμα των μικροαλγών. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 50.000 είδη μικροαλγών, όμως μόνο ένας μικρότερος αριθμός, της τάξης των 30.000 έχει μελετηθεί και αναλυθεί [2].

Τα μικροάλγη αναπτύσσονται με τη βοήθεια του φαινομένου της φωτοσύνθεσης, κατά το οποίο μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική, συμπληρώνοντας ένα κύκλο ανάπτυξης μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα [2]. Με τη φωτοσύνθεση, τα μικροάλγη καταναλώνουν διοξείδιο του άνθρακα και παράγουν οξυγόνο, η ποσότητα του οποίου σε παγκόσμια κλίμακα ανέρχεται σε κάτι παραπάνω από το 75% που απαιτείται από τους ζωντανούς οργανισμούς. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν ακόμη και χωρίς την επίδραση του ηλιακού φωτός, με μόνη προϋπόθεση την παρουσία ορισμένων απλών θρεπτικών συστατικών.

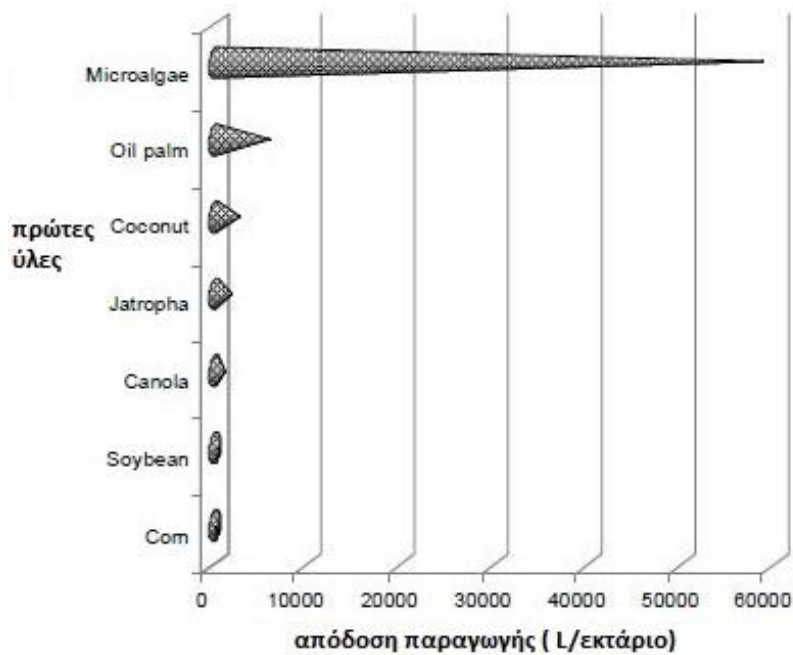
Τα μικροάλγη εμφανίζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα τροποποιώντας τις μεταβολικές τους δραστηριότητες στις αλλαγές του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Οι αλλαγές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των μεταβολικών προϊόντων που παράγουν. Κατά κύριο λόγο, η βιομάζα των μικροαλγών περιέχει πολλές χρήσιμες ουσίες όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και χρωστικές. Το λιπιδικό περιεχόμενο επηρεάζεται από τον τρόπο ανάπτυξης των κυττάρων. Η μέση ποσότητα λιπιδίων που περιέχουν κυμαίνεται μεταξύ 1% και 70%, ενώ υπό ορισμένες συνθήκες σε κάποια είδη μπορεί να φτάσουν στο 90% της ξηρής τους μάζας [2].

Η παραγωγή των μικροαλγών πραγματοποιείται σε συστήματα ανοιχτής καλλιέργειας, όπως πηγές και λίμνες ή σε στενά ελεγχόμενα συστήματα κλειστής καλλιέργειας, όμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται σε εμπορικές διαδικασίες ζύμωσης. Τα πρώτα δεν έχουν μεγάλες απαιτήσεις σε κεφάλαιο και διαχειρίζονται εύκολα, ενώ τα κλειστά απαιτούν υψηλότερες επενδύσεις και έχουν υψηλό κόστος λειτουργίας. Επίσης τα κλειστά συστήματα είναι ανεξάρτητα από τις κλιματικές συνθήκες κι ελέγχονται στενά για την βέλτιστη απόδοση και ποιότητα. Σε αρκετές

περιπτώσεις η ανάπτυξη των μικροαλγών μπορεί να επιταχυνθεί με την προσθήκη ειδικών θρεπτικών ουσιών και επαρκούς αερισμού [2].

Η βιομάζα των μικροαλγών αποτελεί μια ανανεώσιμη πηγή πρώτων υλών, ενώ η βιοχημική της σύσταση με σωστή εκμετάλλευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή αρκετών εμπορεύσιμων προϊόντων για ένα ευρύτερο φάσμα εφαρμογών. Πιο συγκεκριμένα, το υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο των μικροαλγών και η παρουσία τριγλυκεριδίων ευνοεί την παραγωγή βιοντίζελ. Ακόμη, οι σημαντικές ποσότητες των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων που παράγονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας. Επίσης, τα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως η ασταξανθίνη, η β-καροτίνη και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που μπορούν να εξαχθούν από τη βιομάζα των μικροαλγών, αν και βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, παρουσιάζουν αυξημένη εμπορική ζήτηση [3].

Το βασικό πλεονέκτημα της παραγωγής των μικροαλγών είναι οι γρήγοροι ρυθμοί ανάπτυξής τους. Τα μικροάλγη αναπτύσσονται ταχύτερα από όλα τα χερσαία φυτά και συγκεκριμένα διπλασιάζουν τον αριθμό τους κάθε 24 ώρες. Κατά τη διάρκεια της μέγιστης ανάπτυξής τους μπορεί να επιτευχθεί διπλασιασμός ακόμη και κάθε 3.5 ώρες [4]. Επίσης, για την ανάπτυξή τους απαιτείται πολύ μικρότερος αριθμός εκτάσεων σε σύγκριση με τα χερσαία φυτά. Επί παραδείγματι, για την ανάπτυξη βιομάζας περιεκτικότητας 30% βάρους κατά βάρους σε έλαια απαιτείται 49 έως 132 φορές λιγότερη έκταση από αυτή που θα χρειαζόταν για να δώσουν την ίδια ποσότητα σε έλαια καλλιέργειες κράμβης και σόγιας [2]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις (**Εικόνα 1**), η απόδοση ανά εκτάριο των μικροαλγών σε έλαια είναι πάνω από 200 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα πιο παραγωγικά καλλιεργήσιμα φυτά.



Εικόνα 1. Απόδοση σε έλαια μικροαλγών και διαφόρων χερσαίων φυτών.[4]

2.1 Χρήσεις μικροαλγών

Τα μικροάλγη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη μελλοντικών σεναρίων για παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας. Κάποια είδη μικροαλγών είναι αποτελεσματικά στην παραγωγή υδρογόνου και οξυγόνου μέσω της βιοφωτόλυσης, ενώ η βιομάζα τους μπορεί να καεί όπως το ξύλο με ταυτόχρονη παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρισμού. Επίσης, το γεγονός ότι τα έλαια βρίσκονται υπό τη μορφή τριγλυκεριδίων, καθιστά τη βιομάζα των αλγών πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ.

Από την άλλη, λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας, τα μικροάλγη μπορούν να ενισχύσουν τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Το υψηλό πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο μπορεί να συγκριθεί και σε αρκετές περιπτώσεις να ξεπεράσει το αντίστοιχο των συμβατικών τροφών όπως το κόκκινο κρέας. Επίσης, οι υδατάνθρακες που περιέχονται στο κύτταρο των μικροαλγών συναντώνται στη μορφή αμύλου, γλυκόζης, σακχάρων και άλλων πολυσακχαριτών, και εμφανίζουν μεγάλη ληπτικότητα. Από τα λιπιδικά μόρια ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα ω3 και ω6 λιπαρά οξέα. Ακόμη, τα μικροάλγη αποτελούν μια πολύτιμη πηγή βιταμινών (A, B1, B2, B6, B12, C, E) και είναι πλούσια σε χρωστικές όπως η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή [1]. Επιπλέον, εμφανίζουν και ορισμένες ιδιότητες που σχετίζονται με τη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου, όπως είναι η ανακούφιση από την υπερλιπιδαιμία, η καταπολέμηση της υπέρτασης, η προστασία

από την νεφρική ανεπάρκεια, η ενίσχυση της ανάπτυξης του εντερικού Lactobacillus αλλά και η μείωση των επιπέδων της γλυκόζης [5].

Τα μικροάλη εκτός από την διατροφή των ανθρώπων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις τροφές αρκετών ζώων, όπως τα ψάρια, τα κατοικίδια και τα ζώα φάρμας. Στις ιχθυοκαλλιέργειες γίνεται συστηματική χρήση τους για τη διατήρηση του χρώματος της σάρκας των ψαριών και την βελτίωση των βιολογικών τους λειτουργιών. Παρότι αποτελούν τροφή για το ζωοπλαγκτόν, τα μικροάλη βοηθούν επίσης στην σταθεροποίηση και την βελτίωση του είδους της καλλιέργειας [1]. Ακόμη, παρουσιάζουν θετική επίδραση σε κατοικίδια και ζώα φάρμας τόσο ως προς την ανάπτυξη της φυσιολογίας τους (μέσω της παροχής σημαντικών βιταμινών, μετάλλων και λιπαρών οξέων) όσο και ως προς τη βελτίωση βασικών βιολογικών λειτουργιών όπως είναι το ανοσοποιητικό σύστημα και η γονιμότητα του ζώου [6].

Κάποια από τα είδη των μικροαλγών χρησιμοποιούνται επίσης στη βιομηχανία της κοσμετολογίας. Τα εκχυλίσματά τους μπορούν να βρεθούν σε προϊόντα περιποίησης προσώπου και δέρματος, όπως επί παραδείγματι αντιγηραντικές και αναζωογονητικές κρέμες. Ακόμη, μικροάλη μπορούν να βρεθούν σε προϊόντα αντηλιακής προστασίας και περιποίησης μαλλιών.

Τα μικροάλη εκτός από τη χρήση τους ως διατροφικά συμπληρώματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά λόγω συγκεκριμένων μορίων που αναπτύσσουν, όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και χρωστικές ουσίες. Επειδή, τα ζώα και τα περισσότερα φυτά δεν διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα έτσι ώστε να συνθέσουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με 18 άτομα άνθρακα [6], πρέπει να τα προσλαμβάνουν μέσω των τροφών τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το ω-3 λιπαρό οξύ DHA, το οποίο είναι απαραίτητο για τις εγκεφαλικές λειτουργίες, αλλά και οι καρωτίνες οι οποίες δρουν ως προβιταμίνες.

Άλλα μόρια ιδιαίτερης σημασίας τα οποία βρίσκονται στα μικροάλη είναι οι διάφορες φυσικές χρωστικές ουσίες. Μια από τις πιο γνωστές χρωστικές ουσίες είναι το καρωτένιο και από αυτά τα πιο γνωστά είδη τα οποία χρησιμοποιούνται είναι το β-καρωτένιο, η ασταξανθίνη αλλά και η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, το λυκοπένιο και η μπιξίνη [5]. Η πιο σημαντική τους χρήση είναι ως φυσικές χρωστικές ουσίες για τις τροφές αλλά και σαν πρόσθετα συστατικά για τις τροφές των ζώων. Οι καρωτίνες βρίσκουν επίσης εφαρμογή και στη βιομηχανία των καλλυντικών κυρίως στα αντηλιακά σκευάσματα. Η θρεπτική αξία της καρωτίνης οφείλεται κυρίως στην ικανότητα της να δρα ως προβιταμίνη A που σημαίνει ότι μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A [7]. Επίσης τα καρωτενοειδή εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [8].

Τέλος, τα μικροάλγη μπορούν να δεσμεύσουν το διοξείδιο του άνθρακα απαλλάσσοντας την ατμόσφαιρα από ένα βλαβερό αέριο. Επιπροσθέτως, σημαντική είναι η βοήθεια που μπορούν να προσφέρουν στις διαδικασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων για την απομάκρυνση ιόντων NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , τα οποία είναι επιβλαβή για τον υδροφόρο ορίζοντα. Εν ολίγοις, δεσμεύουν ουσίες από τα υγρά απόβλητα, οι οποίες θα περνούσαν στον υδροφόρο ορίζοντα μολύνοντας το νερό, και τις χρησιμοποιούν σαν θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξή τους [2].

2.2 Επεξεργασία μικροαλγών σε μεγάλη κλίμακα

Οι έρευνες για την παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροάλγη συγκεντρώνουν πολύ μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Παρόλα αυτά, δεν έχουν φτάσει σε σημείο να ανταγωνιστούν οικονομικά στην ανοιχτή αγορά τα συμβατικά καύσιμα. Οι λόγοι σχετίζονται με τις μεθόδους που εφαρμόζονται για την επεξεργασία της βιομάζας.

Η επεξεργασία των μικροαλγών περιλαμβάνει αρκετά στάδια, τα οποία καθορίζονται από το επιθυμητό προϊόν που θα παραχθεί. Τα βασικότερα εξ αυτών είναι η φάση της συγκομιδής και της εξαγωγής των ενδοκυτταρικών προϊόντων. Εξαιτίας της πολύ αραιής φύσεως των διαλυμάτων των μικροαλγών, η επεξεργασία τους μπορεί να αποβεί πολύ χρονοβόρα και ενεργοβόρα. Το μεγαλύτερο βάρος πέφτει στην κατάλληλη επιλογή της μεθόδου συγκομιδής, καθώς αυτή καθορίζει τον όγκο της βιομάζας που θα υποστεί περαιτέρω επεξεργασία. Στην **Εικόνα 2** φαίνεται η σχέση που υπάρχει μεταξύ συγκέντρωση βιομάζας προς επεξεργασία και τιμή τελικού προϊόντος.



Εικόνα 2. Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης βιομάζας και τιμής τελικού προϊόντος για τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας. [3]

Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος της βιομάζας, τόσο μικρότερη θα είναι η συγκέντρωσή της, οδηγώντας σε αυξημένο κόστος επεξεργασίας, με αποτέλεσμα πολύ ακριβό τελικό προϊόν. Στην ουσία, η συγκέντρωση και το κόστος είναι δύο αντιστρόφως ανάλογα ποσά. Αυτό δείχνει τη σημασία που έχει η μέθοδος συγκομιδής για τη διεργασία συνολικά.

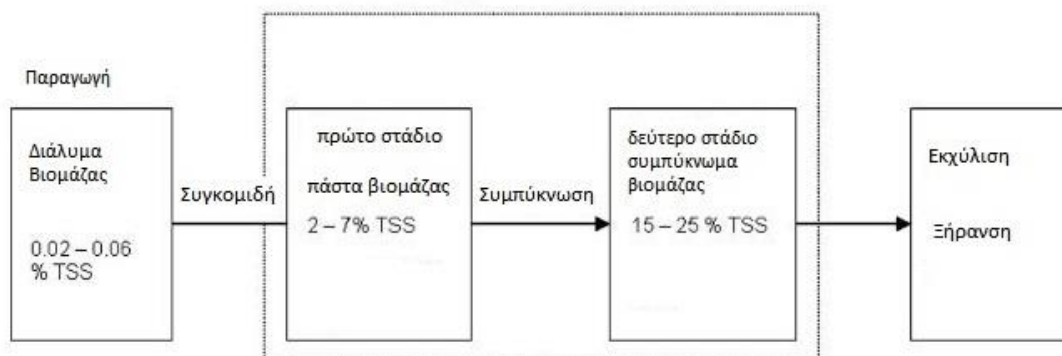
Στην επόμενη ενότητα, παρουσιάζονται ορισμένες μέθοδοι συγκομιδής που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, αλλά και μέθοδοι εξαγωγής ενδοκυτταρικών προϊόντων.

3 Μέθοδοι Συγκομιδής

3.1 Εισαγωγή

Η διεργασία της συγκομιδής αποτελεί μία εκ των σημαντικότερων διεργασιών στην επεξεργασία των μικροαλγών για παραγωγή βιοντίζελ. Κατά τη συγκομιδή, γίνεται ανάκτηση της βιομάζας από το υδατικό διάλυμα της καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσεται. Αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την περαιτέρω επεξεργασία της βιομάζας, ωστόσο περιορίζεται από το αρκετά υψηλό κόστος, το οποίο υπολογίζεται γύρω στο 20-30% της συνολικής διαδικασίας [9]. Το μικρό μέγεθος των κυττάρων των μικροαλγών, η χαμηλή τους συγκέντρωση αλλά και η αρνητικά φορτισμένη τους επιφάνεια [10], καθιστούν την επεξεργασία των μικροαλγών ιδιαίτερα απαιτητική, τόσο από πλευράς χρόνου αλλά και ενέργειας.

Κατά τη διεργασία της συγκομιδής (**Σχήμα 1**), η χαμηλής συγκέντρωσης καλλιέργεια 0,02-0,06% σε σύνολο αιωρούμενων στερεών (TSS), συμπυκνώνεται σε μια υδαρή πάστα συγκέντρωσης από 5-25 % TSS. Η διεργασία συμβατικά μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις, που συμπληρώνουν η μία την άλλη. Στο πρώτο στάδιο (bulk harvesting) πραγματοποιείται διαχωρισμός της βιομάζας των μικροαλγών από το μέσο στο οποίο καλλιεργήθηκε μέσω ιζηματοποίησης και τεχνολογιών επίπλευσης. Το προϊόν του σταδίου αυτού είναι μια υδαρής φάση σε σύνολο αιωρούμενων στερεών 2-7%. Το δεύτερο στάδιο της συγκομιδής (thickening) περιλαμβάνει συστήματα που προκαλούν πύκνωση της υδαρούς φάσης, επιτυγχάνοντας συνολική συγκέντρωση στερεών 15-25% μέσω τεχνικών φυγοκέντρησης και ειδικών φιλτροπρεσσών [11]. Η τιμή της αποκτηθείσας συγκέντρωσης στα στάδια του harvesting αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την μετέπειτα επεξεργασία και ειδικά για το στάδιο της ξήρανσης [12].



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση επεξεργασίας μικροαλγών. [12]

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι συγκομιδής καθεμιά από τις οποίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται σε ορισμένα κριτήρια, ώστε να γίνεται ορθότερος και αποδοτικότερος σχεδιασμός της διεργασίας. Τα κριτήρια αυτά αφορούν τις ιδιότητες των κυττάρων, όπως το μέγεθος, η πυκνότητα, η σύσταση των ενδοκυτταρικών προϊόντων αλλά και η απόδοση του επιθυμητού προϊόντος [2]. Επίσης, επειδή η συγκομιδή καθορίζει τη συγκέντρωση της βιομάζας, η επιλογή της μεθόδου θα πρέπει να ικανοποιεί τα αποδεκτά όρια πυκνότητας ή υγρασίας των επόμενων σταδίων [9]. Ακόμη, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και τα προβλήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα [2].

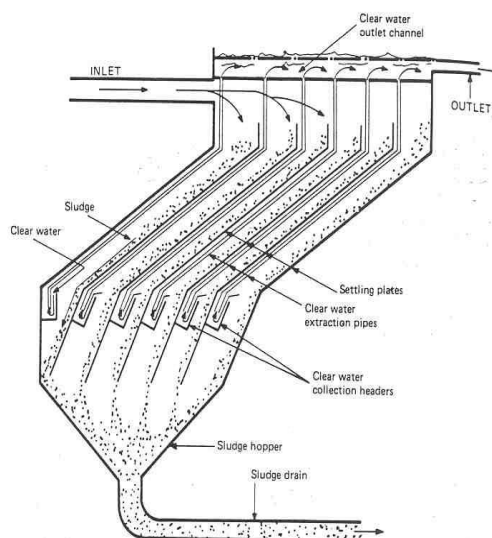
Από τις μεθόδους που έχουν εξετασθεί δεν υπάρχει κάποια που να θεωρείται απόλυτα επαρκής και αποδοτική για κάθε είδος μικροάλγους [10]. Ο συνδυασμός δύο ή και περισσότερων μεθόδων μπορεί να αντισταθμίσει τις αδυναμίες της καθεμιάς ξεχωριστά και λειτουργεί συμπληρωματικά για τη διεργασία της συγκομιδής. Παρακάτω θα παρουσιαστούν ορισμένες μέθοδοι συγκομιδής που χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα.

3.1.1 Φυγοκέντρηση (Centrifugation)

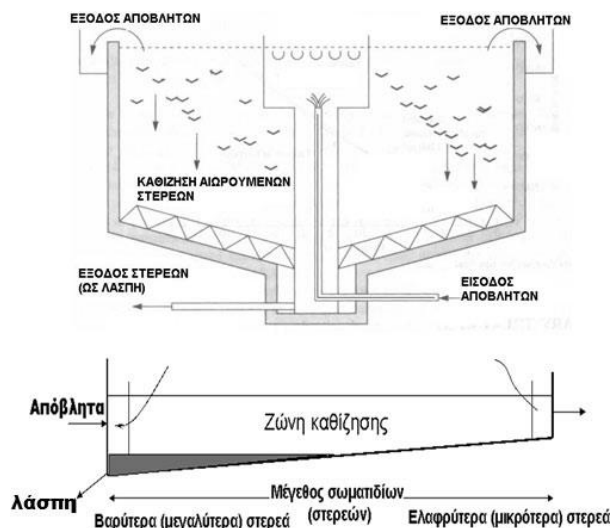
Η φυγοκέντρηση είναι μια εξαιρετικά αξιόπιστη και αποτελεσματική μέθοδος, όπου τα περισσότερα σωματίδια μικροαλγών μπορούν να ανακτηθούν από το μέσο καλλιέργειας με αποδόσεις που φτάνουν μέχρι και το 100%. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο διαχωρισμό φάσεων που επιτυγχάνεται ανάμεσα στη βιομάζα των μικροαλγών και το υδατικό διάλυμα στο οποίο περιέχονται, όταν εκείνη βρεθεί υπό την επίδραση φυγόκεντρων δυνάμεων. Ο διαχωρισμός υπακούει στο νόμο του Stokes και βασίζεται στο διαφορετικό μέγεθος σωματιδίων και πυκνότητας των συστατικών του μέσου. Η συμπεριφορά των μικρότερων σωματιδίων έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοση του διαχωρισμού [13]. Σύμφωνα με τον Moraine η υψηλής ταχύτητας φυγοκέντρηση είναι ιδιαίτερα αποδοτική μέθοδος ανάκτησης μικροαλγών [14]. Με την αύξηση της ταχύτητας αυξάνεται και η απόδοση του διαχωρισμού. Σύμφωνα με τον Grima [15] η φυγοκέντρηση είναι μια γρήγορη και προτιμώμενη μέθοδος διαχωρισμού μικροαλγών. Ιδιαίτερα για προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας η μέθοδος χρησιμοποιείται κατά κόρον καθώς δεν ελλοχεύει κινδύνους χημικής ή βακτηριακής μόλυνσης του προϊόντος [2]. Ωστόσο, η βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτάται από το είδος των μικροαλγών αλλά και από τις παραμέτρους λειτουργίας της μεθόδου. Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές βαρυτικές και διατμητικές δυνάμεις μπορεί να καταστρέψει το ίδιο το κύτταρο [16]. Επίσης, η εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα είναι χρονοβόρα και προβληματική λόγω της αυξημένης ενεργειακής κατανάλωσης, αλλά και του υψηλού παγίου και λειτουργικού κόστους. Η ενεργειακή κατανάλωση της μεθόδου μπορεί να μειωθεί με την εφαρμογή τεχνικών προεπεξεργασίας (pre-concentration steps) που επιτυγχάνουν τη συμπύκνωση της καλλιέργειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εφαρμογή εμβυθιζόμενης μικροδιήθησης πριν και φυγοκέντρησης μετά. Ο συνδυασμός και η εφαρμογή των μεθόδων στο είδος *C. Vulgaris*, έδειξε πως η ενεργειακή κατανάλωση μειώνεται αισθητά [17].

3.1.2 Καθίζηση λόγω βαρύτητας (Gravity sedimentation)

Η καθίζηση είναι μια τεχνική που βασίζεται στην επίδραση της βαρύτητας και διαχωρίζει μια τροφοδοσία αιωρήματος σε μία λασπώδη φάση υψηλής συγκέντρωσης και σε μία υγρή φάση πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Στην περίπτωση των μικροαλγών, η συγκομιδή μέσω καθίζησης διαχωρίζει την βιομάζα των μικροαλγών είτε από μεγάλους όγκους νερού είτε υγρών αποβλήτων. Μπορεί να εφαρμοστεί σε διαχωριστές ταχείας καθίζησης τύπου Lamella αλλά και σε δεξαμενές καθίζησης. Οι διαχωριστήρες τύπου Lamella (**Εικόνα 3**) εξασφαλίζουν μεγαλύτερη επιφάνεια ενεργής καθίζησης λόγω των κεκλιμένων πλακών που διαθέτουν. Οι δεξαμενές καθίζησης είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την συγκέντρωση αιωρημάτων μικροαλγών σε 1,5% TSS. Για υψηλότερες αποδόσεις μπορούν να γίνει χρήση κροκιδωτικών μέσων [18]. Η συγκέντρωση των μικροαλγών αλλά και το μέγεθος του κυττάρου παίζουν σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό [19]. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτερα για τη συγκομιδή μεγάλων κυττάρων, όπως είναι αυτά του είδους *Spirulina*, ενώ αποδεικνύεται ανεπιτυχής για το διαχωρισμό μικροαλγών μικρού μεγέθους [11, 15]. Η συγκομιδή με καθίζηση είναι μια οικονομική διαδικασία με μόνο λειτουργικό κόστος την ενέργεια που απαιτείται για την άντληση της καλλιέργειας στην δεξαμενή. Παρόλα αυτά, η αξιοπιστία της μεθόδου μειώνεται χωρίς τη χρήση κροκιδωτικών μέσων [13]. Ακόμη, είναι πολύ χρονοβόρα διαδικασία και μπορεί να επηρεάσει την ζωτικότητα των κυττάρων λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά την καθίζηση [12].



Εικόνα 3. Διαχωριστήρας τύπου Lamella. Πηγή:
(<http://www.usq.edu.au/course/material/env4203/summary5-70861.htm>)



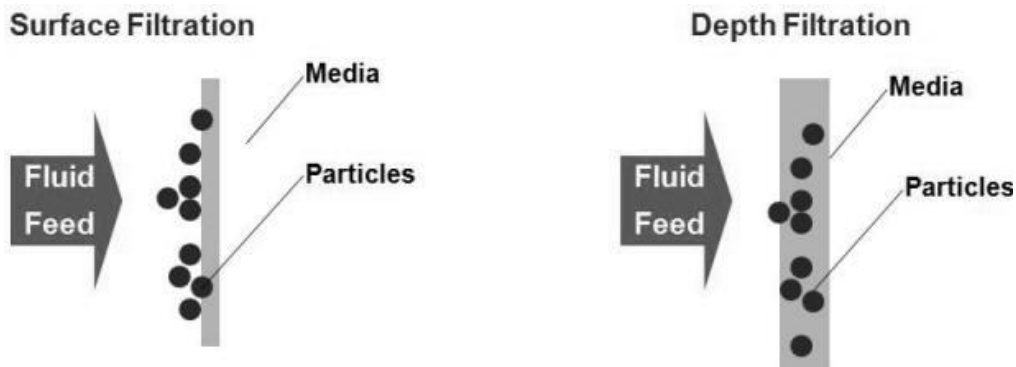
Εικόνα 4. Δεξαμενή καθίζησης. Πηγή: (http://www.kee.gr/perivallontiki/teacher8_3.html)

3.1.3 Διήθηση και κοσκίνισμα (Filtration and screening)

Η διήθηση περιλαμβάνει τη διέλευση του αιωρήματος μέσω της διαπερατού μέσου (φίλτρου) με συγκεκριμένο μέγεθος πόρων. Το μέσο συγκρατεί τα στερεά μεγέθους μεγαλύτερου των πόρων και επιτρέπει στο υγρό να περάσει. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από το είδος των μικροαλγών. Μεγάλα κύτταρα απαιτούν μεγαλύτερου μεγέθους πόρους, με αποτέλεσμα την ταχύτερη διήθηση του αιωρήματος και το χαμηλότερο κόστος λειτουργίας. Η συγκέντρωση του διαλύματος των μικροαλγών είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της διαδικασίας. Υψηλής συγκέντρωσης διαλύματα μπορεί να φράξουν το φίλτρο, ενώ στα πολύ αραιά διαλύματα η διήθηση είναι αναποτελεσματική [20]. Η διήθηση απαιτεί μία πτώση πίεσης προκειμένου το ρευστό να περάσει μέσα από το διηθητικό φίλτρο. Παρότι υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία φίλτρων, η διαδικασία της διήθησης μπορεί να ταξινομηθεί βάσει του μεγέθους των πόρων των φίλτρων που χρησιμοποιούνται:

- makrofiltration (μέγεθος πόρων $>10 \mu\text{m}$)
- microfiltration (" " $0.1-10 \mu\text{m}$)
- ultrafiltration (" " $0.02-0.2 \mu\text{m}$)
- αντίστροφη ώσμωση (" " $<0.001\mu\text{m}$)

Υπάρχουν δύο είδη φίλτρων: Surface filters, όπου τα στερεά σωματίδια σχηματίζουν ένα λεπτό φιλμ στην επιφάνεια του φίλτρου και Depth/deep bed filters, όπου τα στερεά σωματίδια αποθηκεύονται εντός του φίλτρου [13].



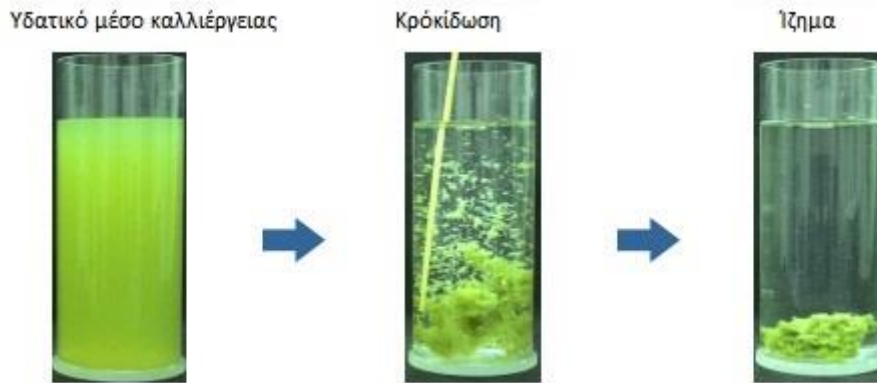
Εικόνα 5. Είδη φίλτρων. Πηγή: (<http://allblackdiesel.com/wp-content/uploads/2014/07/surfacedepth.jpg>)

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που δημιουργείται κατά τη διήθηση είναι η προσκόλληση των κυττάρων στους πόρους του φίλτρου, με αποτέλεσμα να απαιτείται έκπλυση του φίλτρου, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της συγκέντρωσης των μικροαλγών [14]. Σύμφωνα με τον Grima [15] η διήθηση που πραγματοποιείται υπό πίεση ή υπό κενό είναι κατάλληλη για την ανάκτηση μεγάλου μεγέθους μικροαλγών, ενώ ανεπαρκής για κύτταρα στο μέγεθος των βακτηρίων. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για την ανάκτηση εύθραυστων κυττάρων μικροαλγών [2]. Παρακάτω αναφέρονται τρία είδη διήθησης που εφαρμόζουν διαφορετικό είδος ροής πάνω στο φίλτρο.

- Διήθηση εγκάρσιας ροής (tangential ή cross flow filtration) Το διάλυμα που πρόκειται να επεξεργαστεί ρέει εφαιπτομενικά σε μία μεμβράνη, ενώ το συγκρατούμενο από τη μεμβράνη κλάσμα (retentate) ανακυκλώνεται. Η επικάθηση ακαθαρσιών και η ανακτώμενη ροή μπορούν να ελεγχθούν με κατάλληλη έκπλυση και αερισμό του μέσου [21]. Η μέθοδος αυτή έχει βελτιωμένη απόδοση και ενεργειακή κατανάλωση, ωστόσο στο κόστος της πρέπει να συμπεριληφθεί και η αντικατάσταση αντλιών και μεμβρανών [22].
- Εμβυθιζόμενη μικροδιήθηση (Submerged microfiltration): μειώνει τις επικαθίσεις στη μεμβράνη λόγω των φυσαλίδων που παράγονται. Έχει χαμηλό κόστος και επιβάλλει μικρότερες τάσεις [17]. Ωστόσο, παρουσιάζει προβλήματα με τις ακαθαρσίες και η εφαρμογή της σε μεγαλύτερη κλίμακα είναι δύσκολη.
- Δυναμική (Dynamic): η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το στροβιλισμό πάνω από τη μεμβράνη για να προκαλέσει ισχυρότερες τάσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης. Έχει καλύτερη απόδοση από την εγκάρσιας ροής. Επίσης, καταναλώνει λιγότερη ενέργεια και είναι πιο φθηνή [23].

3.1.4 Κροκίδωση (Flocculation)

Η κροκίδωση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα διεσπαρμένα σωματίδια στο διάλυμα συσσωματώνονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ικανότητά τους να καθιζάνουν. Ωστόσο, στα μικροάλλα η αρνητικά φορτισμένη επιφάνειά τους δυσχεραίνει το φαινόμενο. Για το λόγω αυτό γίνεται προσθήκη κροκιδωτικών μέσων, δηλαδή χημικών ουσιών θετικά φορτισμένων με σκοπό την εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου της κυτταρικής επιφάνειας και τη διευκόλυνση της καθίζησής των κυττάρων.



Εικόνα 6 .Κροκίδωση μικροαλγών. Πηγή:
<http://www.et.byu.edu/~wanderto/homealgaeproject/FlocculationProcess.jpg>

Αν και η κροκίδωση παρέχει τη δυνατότητα συγκομιδής μεγάλων ποσοτήτων μικροαλγών, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μια φθηνή και βιώσιμη λύση λόγω ορισμένων εμποδίων που εμφανίζονται [12]. Από τη μία, οι μεγάλες ποσότητες κροκιδωτικών μέσων που απαιτούνται αλλά και η αναγκαιότητα ρύθμισης της τιμής του pH αυξάνουν κατά πολύ το κόστος της μεθόδου. Από την άλλη το κροκιδωτικό μέσο μπορεί να επιμολύνει τόσο την βιομάζα που συλλέγεται αλλά και το μέσο ανάπτυξης της, περιορίζοντας έτσι την επαναχρησιμοποίησή της. Επίσης, η αποδοτικότητα της μεθόδου επηρεάζεται αρνητικά όταν η κροκίδωση χρησιμοποιείται σε μικροάλγη που αναπτύχθηκαν σε θαλασσινό νερό, εξαιτίας του υψηλού ιονικού φορτίου του θαλασσινού νερού [10].

Υπάρχουν διάφοροι τύποι κροκίδωσης που εμφανίζονται στην επεξεργασία των μικροαλγών. Η συνηθέστερη είναι η χημική κροκίδωση, η οποία χωρίζεται σε οργανική ή ανόργανη, ανάλογα με το είδος του κροκιδωτικού που χρησιμοποιείται. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να γίνει συνδυασμός και των δύο. Ακόμη, υπάρχει και η αυτοκροκίδωση κατά την οποία τα κύτταρα των μικροαλγών παρουσιάζουν την τάση να καθιζάνουν μόνο με την αύξηση της τιμής του pH, χωρίς τη χρήση άλλων παραγόντων [11].

3.1.5 Επίπλευση (Flotation)

Η επίπλευση είναι μία μέθοδος συγκομιδής κατά την οποία φυσαλίδες παράγονται σε σύστημα στερεού-υγρού και προσκολλώνται στα στερεά σωματίδια. Στη συνέχεια, τα σωματίδια μεταφέρονται στην επιφάνεια του υγρού και από εκεί μπορούν να συλλεχθούν εύκολα. Στην περίπτωση των μικροαλγών, τα στερεά σωματίδια είναι τα κύτταρα και το υγρό είναι το μέσο καλλιέργειας. Ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζει την επίπλευση είναι η σταθερότητα του αιωρούμενου στερεού. Όσο μικρότερη είναι η σταθερότητα τόσο καλύτερη είναι η επαφή φυσαλίδας στερεού [10]. Κρίσιμη παράμετρο αποτελεί και η υδροφοβικότητα του σωματιδίου, καθώς καθορίζει την αλληλεπίδραση φυσαλίδας σωματιδίου [9]. Επίσης, εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων. Είναι προφανές πως σωματίδια μικρού μεγέθους εμφανίζουν πιο αυξημένες πιθανότητες να ανυψωθούν από τις φυσαλίδες. Η επίπλευση ευνοεί τη συγκομιδή σωματιδίων με διάμετρο μέχρι 500 nm [24]. Το μέγεθος επηρεάζει και τη διαδικασία σύνδεσης των στερεών σωματιδίων και των φυσαλίδων. Η διαδικασία της σύνδεσης μπορεί να θεωρηθεί το

αποτέλεσμα δύο πιθανοτήτων: της πιθανότητας σύγκρουσης με φυσαλίδων και κυττάρων και την πιθανότητα προσκόλλησης της φυσαλίδας και κυττάρου μετά τη σύγκρουση. Αποδεικνύεται πως με τη μείωση του μεγέθους των κυττάρων παρατηρείται μείωση της πιθανότητας σύγκρουσης. Υπάρχουν τρεις τεχνικές επίπλευσης που διακρίνονται με βάση τον τρόπο παραγωγής φυσαλίδων:

- Επίπλευση με διαλυμένο αέρα (Dissolved air flotation)
- Επίπλευση με διεσπαρμένο αέρα (Dispersed air flotation)
- Ηλεκτρολυτική επίπλευση

3.1.5.1 Επίπλευση με διαλυμένο αέρα (Dissolved air flotation)

Η τεχνική αυτή επιτυγχάνεται με την πτώση πίεσης ενός ρεύματος νερού το οποίο έχει προηγουμένως κορεστεί με αέρα σε πίεση μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής. Στη συνέχεια το ρεύμα του νερού εισάγεται σε μία δεξαμενή σε ατμοσφαιρική πίεση και παράγει φυσαλίδες οι οποίες μεταφέρουν τα κύτταρα των μικροαλγών στην επιφάνεια του υγρού. Το μέγεθος των παραγόμενων φυσαλίδων ποικίλει από 10μm έως 100μm και επηρεάζει το σχεδιασμό και τη λειτουργία της όλης διαδικασίας, καθώς για την επίτευξη μικρού μεγέθους φυσαλίδων η πίεση κορεσμού θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής. Επίσης, ο ρυθμός εισαγωγής του αέρα επηρεάζει το μέγεθος των φυσαλίδων και η τιμή του θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να αποτρέπει την αντίστροφη ροή και τη δημιουργία φυσαλίδων κατά μήκος του σωλήνα. Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή απόδοση και σε συνδυασμό με τη χημική κροκίδωση μπορεί να σχηματίσει πάστα 6% TTS [14, 25].

3.1.5.2 Επίπλευση με διεσπαρμένο αέρα (Dispersed air flotation)

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει ένα μηχανικό αναδευτήρα υψηλής ταχύτητας για την παραγωγή των φυσαλίδων και ένα σύστημα εισαγωγής του αέρα στη δεξαμενή. Ο αέρας αναμειγνύεται με το υγρό και στη συνέχεια περνάει από τον διαμεριστή, και έτσι παράγονται φυσαλίδες μεγέθους από 700 μm έως 1500 μm. Για να ευνοηθεί η σύνδεση φυσαλίδων και κυττάρων γίνεται χρήση τασιενεργών ουσιών οι οποίες επηρεάζουν την υδροφοβικότητα του κυττάρου.

Η μέθοδος της επίπλευσης έχει χαμηλό κόστος και χρησιμοποιείται για τη συγκομιδή βιομάζας σε βιομηχανική κλίμακα. Για την βελτίωση της απόδοσης η μέθοδος συνδυάζεται με χρήση κροκιδωτικών παραγόντων, οι οποίοι όμως ενισχύουν τον κίνδυνο μόλυνσης του μέσου της καλλιέργειας ή ακόμα και των επιθυμητών προϊόντων [12]. Η ηλεκτρολυτική επίπλευση, η τελευταία τεχνική επίπλευσης, θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο καθώς έχει συμπεριληφθεί στη γενικότερη κατηγορία των ηλεκτρολυτικών μεθόδων συγκομιδής μικροαλγών.

3.1.6 Ηλεκτροφόρηση

Μία αρκετά αποδοτική μέθοδος η οποία μπορεί να ελαττώσει τα προβλήματα μόλυνσεων που μπορεί να προκαλέσει η κροκίδωση, είναι η ηλεκτροφόρηση. Πρόκειται για

μια ηλεκτροχημική μέθοδο που βασίζεται στην ιδιότητα των μικροαλγών να συμπεριφέρονται σαν κolloειδή και κατά συνέπεια να μπορούν να διαχωριστούν από το υδατικό μέσο καλλιέργειας με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου [26]. Η ηλεκτροφόρηση είναι φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, παρουσιάζει ευελιξία, αποτελεσματικότητα και είναι οικονομικά συμφέρουσα [27]. Περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές τεχνικές:

- Ηλεκτρολυτική πήξη
- Ηλεκτρολυτική επίπλευση
- Ηλεκτρολυτική κροκίδωση

3.1.6.1 Ηλεκτρολυτική πήξη

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει φυσικοχημικούς μηχανισμούς για το διαχωρισμό της βιομάζας από το υδατικό μέσο καλλιέργειας. Βασίζεται στη χρήση ηλεκτροδίων αλουμινίου και σιδήρου που παράγουν μεταλλικά ιόντα τα οποία συνδυάζονται με τα αρνητικά φορτισμένα κύτταρα και μεταφέρονται προς την άνοδο. Ο διαχωρισμός των μικροαλγών με την τεχνική αυτή επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ενέργεια που θα δοθεί στο ηλεκτρικό πεδίο. Αύξηση της ενέργειας μπορεί να επιφέρει καλύτερη ανάκτηση βιομάζας, καθώς παράγονται περισσότερα κατιόντα, και μείωση του χρόνου ανάκτησης. Ωστόσο, προκαλεί και αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά για τα κύτταρα και σε αρκετές περιπτώσεις να τα καταστρέψει. Σε σχέση με την κροκίδωση, η ηλεκτρολυτική πήξη μπορεί να θεωρηθεί ανώτερη καθώς έχει χαμηλότερο κόστος, μικρότερο χρόνο διαχωρισμού αλλά και ελάχιστες πιθανότητες μόλυνσης της βιομάζας από τα μεταλλικά κατιόντα [12].

3.1.6.2 Ηλεκτρολυτική επίπλευση

Η ηλεκτρολυτική επίπλευση είναι παρόμοια μέθοδος με την ηλεκτρολυτική πήξη, καθώς προκαλεί αποσταθεροποίηση των κυττάρων της βιομάζας. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι η ηλεκτρολυτική επίπλευση χρησιμοποιεί για την κάθοδο ένα ανενεργό μέταλλο, το οποίο παράγει φυσαλίδες υδρογόνου από την ηλεκτρόλυση του νερού. Οι φυσαλίδες αυτές προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων και τα μεταφέρουν στην επιφάνεια του διαλύματος [28,29]. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται η φθορά του ηλεκτροδίου της καθόδου και το υψηλό κόστος του ανορθωτή ισχύος. Παρόλα αυτά, η μέθοδος προτιμήθηκε για τη συγκομιδή μικροαλγών που αναπτύχθηκαν σε θαλασσινό νερό.

3.1.6.3 Ηλεκτρολυτική κροκίδωση

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κίνηση των αρνητικά φορτισμένων κυττάρων των μικροαλγών προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου. Φτάνοντας στην άνοδο, τα κύτταρα αποφορτίζονται και σχηματίζουν συσσωματώματα. Λόγω της ηλεκτρόλυσης του νερού, παράγονται φυσαλίδες οι οποίες συμβάλλουν στη μεταφορά των συσσωματωμάτων στην επιφάνεια του διαλύματος [29]. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής έναντι των άλλων δύο ηλεκτρολυτικών μεθόδων, είναι πως δεν απαιτείται η χρήση κροκιδωτικών μέσων. Επίσης, είναι εφικτή η ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης ενέργειας με την

αριστοποίηση ορισμένων παραμέτρων, όπως η διαφορά δυναμικού, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου και η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου, εμφανίζεται συχνά το φαινόμενο της επικάθησης ακαθαρσιών στο ηλεκτρόδιο της καθόδου.

3.1.7 Μαγνητικός διαχωρισμός

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως μέθοδος συγκομιδής μικροαλγών παρουσιάζει ο μαγνητικός διαχωρισμός. Η μέθοδος βασίζεται στις ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων των μικροαλγών και των σωματιδίων με τις μαγνητικές ιδιότητες, από την οποία δημιουργούνται συσσωματώματα. Παρουσία μαγνητικού πεδίου, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συσσωματωμάτων από το μέσο καλλιέργειας. Η έλξη μεταξύ κυττάρων και σωματιδίων μπορεί να αποδοθεί μεταξύ άλλων, στα διαφορετικά φορτία που εμφανίζουν τα κύτταρα και τα σωματίδια. Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από το είδος της καλλιέργειας αλλά και από το pH, καθώς όπως θα παρουσιαστεί σε επόμενο κεφάλαιο, η τιμή του pH επηρεάζει το φορτίο τόσο των κυττάρων όσο και των σωματιδίων [30]. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ευκολία χειρισμού, βιοσυμβατότητα αλλά και δυνατότητα ανακύκλωσης τόσο των μαγνητικών σωματιδίων όσο και του μέσου καλλιέργειας.



Εικόνα 7. Μαγνητικός διαχωρισμός μικροαλγών.

3.2 Σύνοψη μεθόδων συγκομιδής

Συνοψίζοντας, εξαιτίας της διαφορετικότητας κάθε είδους δεν είναι εύκολο να θεωρηθεί κάποια από τις προαναφερθείσες μεθόδους ως πανάκεια για τη συγκομιδή μικροαλγών. Η επιλογή θα πρέπει να βασιστεί στο είδος του κυττάρου αλλά και στο επιθυμητό τελικό προϊόν. Μικροάλγη με μεγάλο μέγεθος κυττάρου, μεγαλύτερη πυκνότητα από το μέσο καλλιέργειας γεγονός που διευκολύνει την καθίζησή τους, εμφανίζουν ιδιαίτερη προτίμηση [12]. Ιδανική μπορεί να θεωρηθεί η μέθοδος που είναι ανεξάρτητη του μικροάλγους, έχει χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις, περιορίζει την χρήση χημικών ουσιών, και διευκολύνει την εξαγωγή και συλλογή των ενδοκυτταρικών προϊόντων [11]. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα ορισμένων εκ των μεθόδων συγκομιδής που αναφέρθηκαν, ενώ στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη συγκομιδή σε είδη του μικροάλγους *Nannochloropsis*.

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων συγκομιδής.[2]

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Φυγοκέντρηση	Γρήγορη, απλή, αποδοτική	Ενεργοβόρα
Καθίζηση λόγω βαρύτητας	Χαμηλού κόστους	Αργή διαδικασία, αλλοίωση προϊόντος, εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου
Διήθηση εγκάρσιας ροής	Ανακύκλωση μέσου καλλιέργειας, απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών	Επικάθηση ακαθαρσιών στη μεμβράνη, απαιτεί συχνή χρήση
Εμβυθιζόμενη μικροδιήθηση	Χαμηλού κόστους, μικρότερες τάσεις, λιγότερες επικαθίσεις στη μεμβράνη	Προβληματική μετάβαση σε μεγάλη κλίμακα
Κροκίδωση	Υψηλή ανάκτηση	Τοξικότητα, αδυναμία ανακύκλωση υδατικού μέσου, μη αποδοτική, διάρρηξη κυττάρων
Επίπλευση με διαλυμένο αέρα	Χαμηλού κόστους, εύκολη εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα	Απαιτεί τη χρήση κροκιδωτικών παραγόντων, επηρεάζει την ανακύκλωση του υδατικού μέσου και τα εκχυλιζόμενα προϊόντα
Ηλεκτρολυτική κροκίδωση	Υψηλή απόδοση	Υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, επικαθίσεις στο ηλεκτρόδιο της καθόδου

Ενδεικτικά στον **Πίνακα 2** γίνεται σύγκριση μεταξύ των μεθόδων συγκομιδής στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διάφορα είδη μικροαλγών του είδους *Nannochloropsis*.

Πίνακας 2. Μέθοδοι συγκομιδής που εφαρμόστηκαν σε είδη του μικροάλγους *Nannochloropsis*. [31]

Είδος Μικροάλγους	Αντιδρών	Μέθοδος	Αναλογία	Απόδοση συγκομιδής	Χρόνος διεργασίας (min)
<i>N. salina</i>	Αλουμίνιο	Κροκίδωση	10,8 mg/L	79 %	40
<i>N. salina</i>	Επικαλυμμένα μαγνητικά σωματίδια	Μαγνητικός διαχωρισμός	>0,8 g/g (g σωματιδίων/g βιομάζας)	20 – 40 %	11- 20
<i>N. oculata</i>	Πολύ (γ-γλουταμικό οξύ)	Κροκίδωση	22,03 g/L	96 %	120
<i>N. oculata</i>	Αύξηση pH	Κροκίδωση	-	90 %	>10
<i>N. maritima</i>	Μη επικαλυμμένα μαγνητικά σωματίδια	Μαγνητικός διαχωρισμός	120 mg/L	97,5 %	4

4 Συγκομιδή μικροαλγών με χρήση μαγνητικών σωματιδίων

Ο μαγνητικός διαχωρισμός, ως μέθοδος συγκομιδής μικροαλγών, αναφέρθηκε πρώτη φορά πριν από 40 χρόνια. Τότε η έρευνα είχε επικεντρωθεί στην αποκατάσταση της ποιότητας του νερού των λιμνών, σαν συνέπεια της αυξανόμενης ανάπτυξης μικροαλγών λόγω του φαινομένου του ευτροφισμού[32]. Τα τελευταία χρόνια, η σημασία των μικροαλγών και των υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων τους έχει αυξηθεί στον τομέα της υγείας, της διατροφής και των βιοκαυσίμων. Η αποδοτική συγκομιδή των μικροαλγών αποτελεί ένα ιδιαίτερα δύσκολο και μεγαλεπήβολο σχέδιο. Οι λόγοι, όπως αναφέρθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα, σχετίζονται με το μικρό μέγεθος των κυττάρων, τη συγκέντρωση της βιομάζας στα υδατικά της διαλύματα και των συνθηκών που επικρατούν στο μέσο καλλιέργειας [33,34,35]. Έτσι, η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας αποδοτικής και οικονομικά συμφέρουσας μεθόδου καθίσταται επιτακτική. Οι περισσότερες από τις μεθόδους που έχουν εφαρμοστεί και εφαρμόζονται δεν ικανοποιούν τις απαιτήσεις σε ανακύκλωση υλικού, σε χαμηλή τοξικότητα, σε οικονομικές πρώτες ύλες και σε χαμηλό λειτουργικό κόστος [9,36]. Έτσι, η συγκομιδή μικροαλγών με χρήση μαγνητικών σωματιδίων φαντάζει σαν μία πολύ καλή εναλλακτική και επαρκής μέθοδος.

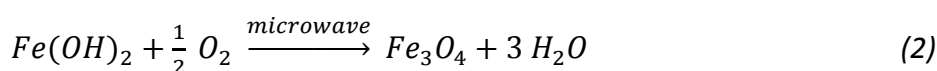
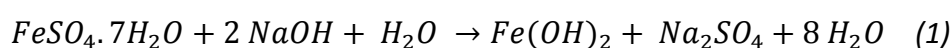
4.1 Μαγνητικά σωματίδια

Τα μαγνητικά σωματίδια, και κυρίως το Fe_3O_4 , έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των μοναδικών τους ιδιοτήτων και του μεγάλου εύρους εφαρμογών που καλύπτουν. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των σωματιδίων αυτών είναι ότι μπορούν να συλλεχθούν από το περιβάλλον στο οποίο έχουν εισαχθεί, με τη χρήση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου [37].

4.2 Σύνθεση μαγνητικών σωματιδίων

Η σύνθεση των μαγνητικών σωματιδίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ιζηματοποίηση με χρήση βάσεων, σύνθεση μέσω γαλακτώματος, θερμόλυση οργανομεταλλικών ενώσεων, υδροθερμική και sol- gel σύνθεση. Λίγες όμως από αυτές παράγουν σωματίδια με ικανοποιητική κατανομή μεγέθους. Ευρεία χρήση παρουσιάζει η ιζηματοποίηση, επειδή είναι εύκολη και μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες σωματιδίων [32].

Μία ακόμη μέθοδος για την παρασκευή σωματιδίων βασίζεται στη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων. Όπως είναι γνωστό η ακτινοβολία μικροκυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για θέρμανση, αλλά και για την ενίσχυση της ενέργειας ενεργοποίησης των αντιδράσεων. Εν συγκρίσει με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης, οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ακτινοβολία μικροκυμάτων, παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως είναι οι υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης και απόδοσης σε μικρό χρονικό διάστημα. Επίσης, μπορούν να προσφέρουν την απαραίτητη ενέργεια ενεργοποίησης στα χημικά αντιδραστήρια. Για τον λόγο αυτό, η χρήση της ενέργειας των μικροκυμάτων για τη σύνθεση οργανικών και ανόργανων ουσιών συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον [38]. Η μέθοδος σύνθεσης είναι απλή, γρήγορη και παράγει σωματίδια με σχετικά όμοια κατανομή μεγέθους. Σύμφωνα με τη μέθοδο, τα μαγνητικά μονοδιασπαρμένα οξείδια του σιδήρου Fe_3O_4 συντίθενται υπό την επίδραση ακτινοβολίας μικροκυμάτων σε $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ σε αλκαλικό περιβάλλον, σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό:



4.3 Χαρακτηριστικά μαγνητικών σωματιδίων

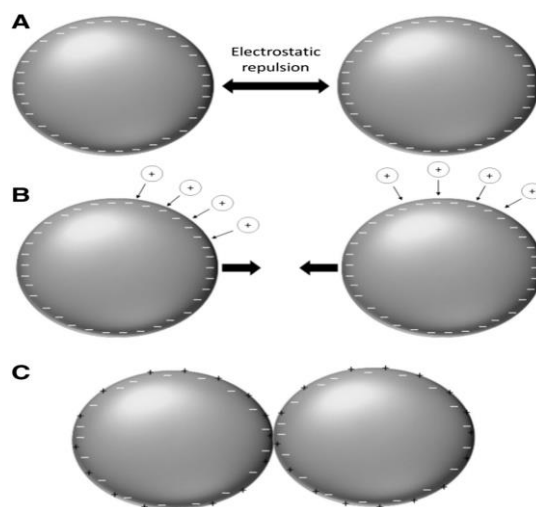
Τα μαγνητικά σωματίδια πρέπει να έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να οδηγήσουν σε ένα αποδοτικό διαχωρισμό. Βασικό ρόλο στην όλη διαδικασία διαδραματίζει το σχήμα των σωματιδίων. Το σχήμα θα πρέπει να είναι σφαιρικό επειδή προσδίδει καλύτερες υδροδυναμικές ιδιότητες και τα καθιστά ανθεκτικότερα σε μηχανική καταπόνηση. Σημαντική παράμετρος είναι επίσης, το μέγεθος τους και η διασπορά. Σχετικά με την κατανομή μεγέθους, θα πρέπει να υπάρχει, εφόσον είναι εφικτό, μονοδιασπορά. Όσο μεγαλύτερα είναι τα σωματίδια τόσο ισχυρότερες είναι οι μαγνητικές τους ικανότητες. Ωστόσο, τα μεγάλα σε μέγεθος σωματίδια εμφανίζουν υψηλότερη πυκνότητα από το νερό με αποτέλεσμα να καθιζάνουν ευκολότερα. Συνυπολογίζοντας αυτούς τους παράγοντες, τα σωματίδια θα πρέπει να έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια στον μικρότερο δυνατό όγκο και καλή μαγνητική απόκριση. Σε εφαρμογές που απαιτούν ισχυρή μαγνητική ικανότητα χρησιμοποιούνται σωματίδια μικρού μεγέθους. Ακόμη, σε περιπτώσεις διαχωρισμού κυττάρων ή μορίων, σημαντική παράμετρο αποτελεί το πορώδες των σωματιδίων. Για μικρά μόρια, τα σωματίδια θα πρέπει να μην είναι πορώδη, ώστε να περιορίζονται τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας [32]. Στην περίπτωση των μικροαλγών, και ανάλογα με το μέγεθος του κυττάρου, χρησιμοποιούνται μαγνητικά σωματίδια της τάξης των nm. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε

χρήση μαγνητικά τροποποιημένων σωματιδίων. Η μέθοδος σύνθεσης παρουσιάζεται αναλυτικότερα στο κεφάλαιο της πειραματικής διαδικασίας.

4.4 Πιθανοί μηχανισμοί πρόσδεσης μαγνητικών σωματιδίων-μικροαλγών

Στο υδατικό περιβάλλον, τα σωματίδια διατηρούν διάφορα επιφανειακά φορτία, τα οποία προκαλούν το σχηματισμό ηλεκτρικής στοιβάδας και τη δημιουργία ηλεκτροστατικών τάσεων, που οδηγούν στη μεταξύ τους έλξη ή απώθηση. Όσο αναφορά την σύνδεση των κύτταρων των μικροαλγών με τα μαγνητικά σωματίδια εντός υδατικού περιβάλλοντος, ένα ευρύ φάσμα αλληλεπιδράσεων λαμβάνουν χώρα, όπως δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές έλξεις και διαμοριακές δυνάμεις οξέων- βάσεων [39].

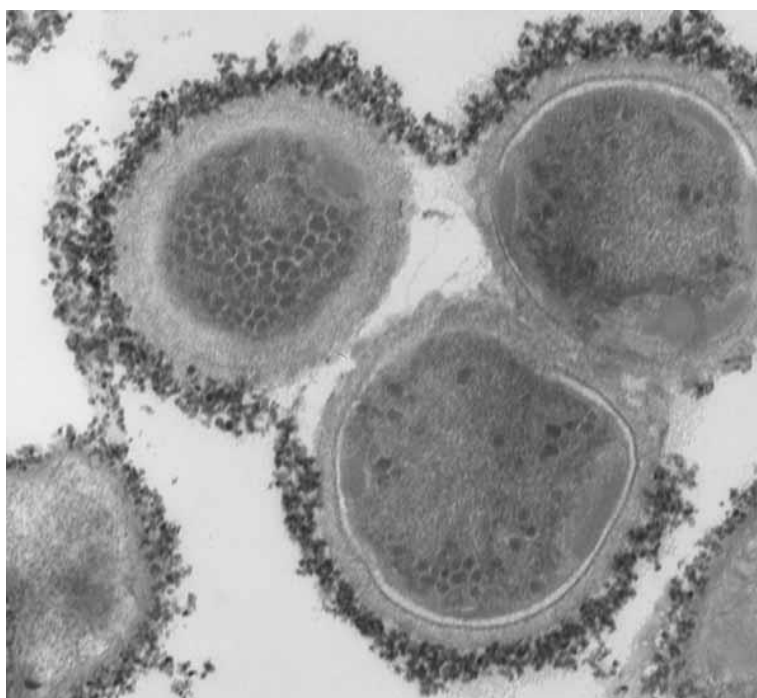
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [40], η σύνδεση των μαγνητικών σωματιδίων και των κυττάρων βασίζεται σε τέσσερεις βασικούς μηχανισμούς: συμπίεση της εξωτερικής διπλοστοιβάδας των σωματιδίων, κροκίδωση, εξουδετέρωση φορτίου και γεφύρωση (bridging). Ο πρώτος μηχανισμός οφείλεται στην παρουσία αλάτων στο υδατικό μέσο, η οποία μπορεί να προκαλέσει συμπίεση της διπλοστοιβάδας, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των σωματιδίων και των κυττάρων. Ταυτόχρονα οι απωστικές δυνάμεις υπερνικούνται από δυνάμεις van der Waals και προκαλείται σύνδεση μεταξύ κυττάρων και σωματιδίων. Η κροκίδωση συμβαίνει όταν τα μαγνητικά σωματίδια αιχμαλωτίζουν τα κύτταρα και σχηματίζουν ένα κολλοειδές σύστημα. Η αποσταθεροποίηση των σωματιδίων μέσω εξουδετέρωσης του φορτίου τους υφίσταται όταν τα αιωρούμενα στερεά του διαλύματος, δηλαδή τα κύτταρα, έχουν αντίθετο φορτίο από τα σωματίδια. Η γεφύρωση προκύπτει όταν τα σωματίδια σχηματίζουν ένα είδος αλυσίδας που περιβάλλει και συγκρατεί τα κύτταρα, χωρίς αυτά να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους.



Εικόνα 8. Μηχανισμός εξουδετέρωσης φορτίου. [3]

Στην **Εικόνα 8** περιγράφεται ο μηχανισμός εξουδετέρωσης φορτίου. Αρχικά τα κύτταρα φέρουν το φορτίο τους και απωθούνται μεταξύ τους λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Με την προσθήκη σωματιδίων αντίθετου φορτίου, τα κύτταρα αποσταθεροποιούνται, το φορτίο τους εξουδετερώνεται και στη συνέχεια σχηματίζονται συσσωματώματα.

Όσο αναφορά τη γεφύρωση, ο μηχανισμός τους παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Τα μαγνητικά σωματίδια λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας περιβάλλουν τα κύτταρα με αποτέλεσμα να δημιουργούν συσσωματώματα σωματιδίων και κυττάρων.



Εικόνα 9. Ενδεικτική εικόνα μηχανισμού γεφύρωσης. [40]

4.5 Ανάκτηση κυττάρων και ανακύκλωση σωματιδίων

Η πρακτική εφαρμογή του μαγνητικού διαχωρισμού, προϋποθέτει την ανάπτυξη μιας οικονομικά εφικτής και αξιόπιστης μεθόδου ανακύκλωσης των μαγνητικών σωματιδίων. Στον τομέα αυτό έχει πραγματοποιηθεί σημαντική έρευνα και προτείνονται εναλλακτικές διαδικασίες:

- A. Χρήση υδροχλωρικού οξέος (HCl) για διαλυτοποίηση των οξειδίων του σιδήρου από τα συσσωματώματα με τα μικροάλγη. Τα μικροάλγη ανακτώνται με διήθηση, ενώ το διήθημα επαναχρησιμοποιείται για τη σύνθεση Fe₃O₄ [41].
- B. Χρήση πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄ 10%) για την απομαγνήτιση των κυττάρων σε λουτρό υπερήχων με θερμοκρασία 40 °C. Η ανάκτηση των

κυττάρων και σε αυτή την περίπτωση γίνεται με διήθηση . Παρόλα αυτά, η χρήση των ισχυρών οξέων θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην επηρεαστεί το κύτταρο και να καταστραφούν τα επιθυμητά προϊόντα [39]. Επίσης, θα πρέπει να συνυπολογιστεί το γεγονός ότι η χρήση ισχυρών χημικών προϋποθέτει υψηλό πάγιο κόστος και ορθή περιβαλλοντική διαχείριση.

- C. Αποσύνδεση των μαγνητικών σωματιδίων από τα κύτταρα με μεταβολή του pH και μηχανική ανάδευση για 90 με 180 λεπτά [42].

Αν και υπάρχουν πολλών ειδών μαγνητικά υλικά, η χημική σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα και το κόστος παραγωγής θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν όσο αναφορά τις πιθανές εφαρμογές στη συγκομιδή μικροαλγών. Πολλά μεταλλικά οξειδία τύπου M_AO_B και της κυβικής διάταξης του MFe_2O_4 ($M= Mn, Fe, Co, Ni, Zn$ και Cu), είναι ευρέως διαδεδομένα μαγνητικά υλικά και εμφανίζουν καλύτερες μαγνητικές ιδιότητες από τα οξειδία του σιδήρου [32]. Ωστόσο, οξειδώνονται ευκολότερα και έχουν μικρότερη βιοσυμβατότητα. Επίσης, υπάρχουν και άλλα είδη μαγνητικών σωματιδίων όπως το $FePt$, $FePd$ και $FeCo$, τα οποία έχουν καλύτερη μαγνητοκρυσταλλική ανισοτροπία και χημική σταθερότητα. Το μειονέκτημά τους όμως είναι το υψηλό κόστος παραγωγής [43]. Για τους λόγους αυτούς, ο Fe_3O_4 χρησιμοποιείται κατά κόρον σε βιολογικές εφαρμογές.

5 Μέθοδοι διάρρηξης κυττάρων

5.1 Εισαγωγή

Η εξαγωγή των ενδοκυτταρικών συστατικών από τα κύτταρα των μικροαλγών, όπως και η συγκομιδή τους, πραγματοποιούνται με διεργασίες οι οποίες έχουν πολύ υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Όσο αναφορά τη διάρρηξη των κυττάρων των μικροαλγών, η αυξημένη ενεργειακή κατανάλωση είναι το αποτέλεσμα συνδυασμού διάφορων παραγόντων. Ανάμεσα τους είναι το κόστος για την ξήρανση της βιομάζας μετά τη συγκομιδή, οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας της διεργασίας εξαγωγής και το κόστος διαχωρισμού των επιθυμητών προϊόντων από τους οργανικούς διαλύτες ή τα υπερκρίσιμα ρευστά [9]. Κύριος στόχος καθίσταται η αριστοποίηση της σχέσης μεταξύ απόδοσης επιθυμητών προϊόντων και ενεργειακής κατανάλωσης, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται το μεγαλύτερο οικονομικό κέρδος.

Η σημαντικότερη αιτία για τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις είναι τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών. Η δομή του τοιχώματος είναι περίπλοκη και επηρεάζει την αποδοτικότητα της διάρρηξης. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από ένα παχύ και σκληρό εξωτερικό στρώμα. Βασικά συστατικά του είναι σύνθετοι υδατάνθρακες και γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίοι παρουσιάζουν εξαιρετική αντοχή σε μηχανικούς και χημικούς παράγοντες [9].

Κρίσιμη παράμετρος που επιδρά αρνητικά στην ανάκτηση των ενδοκυτταρικών προϊόντων είναι η υγρασία της βιομάζας. Η μη αναμειξιμότητα του νερού της υγρής βιομάζας με τους μη-πολικούς οργανικούς και υπερκρίσιμους διαλύτες που διαλύουν τα λιπίδια, αναγκάζει τα κύτταρα να παραμείνουν στην υδατική φάση λόγω του φορτίου της επιφάνειάς τους, και κατά αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η απευθείας επαφή τους με την οργανική φάση. Το φαινόμενο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη χαμηλή ανάκτηση σε ενδοκυτταρικά προϊόντα.

Ανάλογα με την προεπεξεργασία που έχει υποστεί η βιομάζα των μικροαλγών, πριν υποβληθεί σε εξαγωγή ελαίων βρίσκεται σε μια από τις ακόλουθες φυσικές καταστάσεις: συμπυκνωμένη, συμπυκνωμένη κατόπιν διαταραχής ή σε μορφή ξηρής σκόνης. Μια αποτελεσματική εκχύλιση, περιλαμβάνει την έκθεση της βιομάζας σε ένα διαλύτη έκλυσης, ο οποίος προκαλεί την εξαγωγή των λιπιδίων από τις μήτρες των κυττάρων. Ιδανική είναι μια τεχνολογία εξαγωγής λιπιδίων από μικροάλγη η οποία παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τα λιπίδια, ώστε να μην πραγματοποιείται ταυτόχρονη εξαγωγή ανταγωνιστικών ως προς αυτά παραγόντων, όπως οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες. Επίσης, η εφαρμοζόμενη τεχνολογία θα πρέπει να είναι αποδοτική,

τόσο από άποψη χρόνο όσο και ενέργειας, σχετικά οικονομική αλλά και ασφαλής [44].

Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν ορισμένες μέθοδοι εξαγωγής ελαίων, οι οποίες ταξινομούνται με βάση το μηχανισμό διάρρηξης του κυττάρου.

5.2 Μέθοδοι

Οι μέθοδοι εξαγωγής λιπιδίων χωρίζονται σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες με κριτήριο το μηχανισμό διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος:

- Μηχανικές
 - Μικροκύματα
 - Επεξεργασία με υπερήχους
 - Επεξεργασία με σφαιρόμυλο
 - Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις
 - Ηλεκτρομετασχηματισμός
 - Κατάψυξη
 - Υπερκρίσιμα ρευστά
- Μη μηχανικές
 - Χημικές
 - ✓ Χημικές ουσίες
 - ✓ Ωσμωτικό σοκ
 - Βιολογικές

5.2.1 Μηχανικές μέθοδοι

Οι μηχανικές μέθοδοι διασπών το κυτταρικό τοίχωμα των μικροαλγών υποβάλλοντας το σε ισχυρές μηχανικές τάσεις, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ευρεία κλίμακα ανεξάρτητα από το είδος των μικροαλγών. Επιπλέον, εμφανίζουν μειωμένο κίνδυνο αποδόμησης των επιθυμητών προϊόντων κατά τη διάρκεια της διάτρησης. Ορισμένες μηχανικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν μόνο σε ξηρή βιομάζα, ενώ άλλες εμφανίζουν καλύτερη απόδοση όταν εφαρμοστούν σε υγρή.

5.2.1.1 Μικροκύματα

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας 2450 MHz, προκαλώντας την αύξηση της θερμοκρασίας των κυττάρων. Τα μικροκύματα επιφέρουν ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου των πολικών μορίων, όπως είναι αυτά του νερού. Τα μόρια του νερού που εκτίθενται σε αυτή τη συχνότητα, φθάνουν στο σημείο βρασμού πιο γρήγορα διαστέλλοντας έτσι το κυτταρικό τοίχωμα και αυξάνοντας την ενδοκυτταρική πίεση. Εξαιτίας των μεταβολών αυτών, η κυτταρική μεμβράνη διαρρηγνύεται διευκολύνοντας την εξαγωγή των ενδοκυτταρικών προϊόντων. Επειδή τα μόρια του νερού είναι αυτά απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η μέθοδος

εμφανίζει καλύτερη απόδοση όταν εφαρμόζεται σε πιο αραιά αιωρήματα διαλύματα βιομάζας [45]. Η μέθοδος των μικροκυμάτων είναι απλή, αποδοτική και γρήγορη λόγω της ταχείας διεύθυνσης των κυμάτων στα κύτταρα των μικροαλγών, ωστόσο, εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα. Εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να προκληθεί διάσπαση των θερμικά ευαίσθητων συστατικών, και για τον λόγο αυτό απαιτείται η ύπαρξη ενός συστήματος ψύξης, που θα ελαττώνει το πρόβλημα αυτό. Ακόμη, η μετάβαση της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα, αν και απλή, είναι δύσκολη λόγω των μεγάλων καταναλώσεων ενέργειας [9].

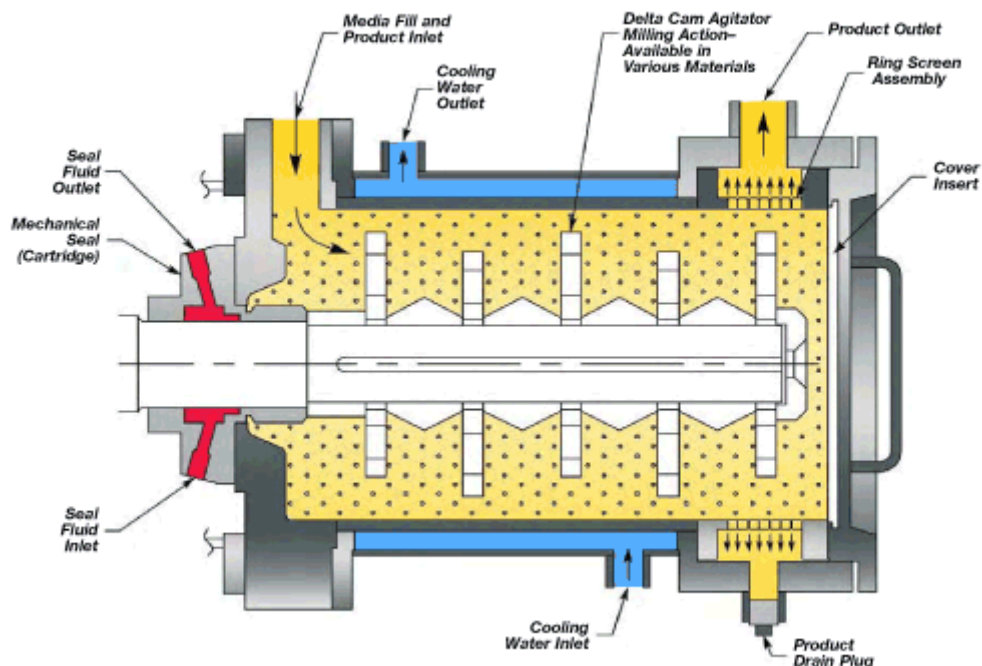
5.2.1.2 Επεξεργασία με υπερήχους

Η επεξεργασία με υπερήχους είναι μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος για την διάρρηξη των κυττάρων των μικροαλγών. Κατά την εκπομπή υπερήχων σε ένα διάλυμα δημιουργούνται φυσαλίδες λόγω της μετακίνησης των μορίων από τα ακουστικά κύματα. Με την εφαρμογή κυμάτων υψηλής έντασης, οι φυσαλίδες συμπιέζονται στο μικρότερο δυνατό όγκο και εκρήγνυνται, αναπτύσσοντας θερμότητα, φως, ελεύθερες ρίζες και κρουστικά κύματα, το οποία τρυπάνε το κυτταρικό τοίχωμα. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου επηρεάζεται από το ιξώδες και τη θερμοκρασία του υγρού. Χαμηλή θερμοκρασία ευνοεί το φαινόμενο της σονόλυσης και μειώνει τις πιθανότητες καταστροφής θερμοευαίσθητων συστατικών του κυττάρου. Επίσης, η δημιουργία φυσαλίδων είναι πιο έντονη σε χαμηλές συχνότητες. Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή απόδοση όσο αφορά την διάρρηξη των κυττάρων και θεωρείται ιδανικότερη για ορισμένα είδη μικροαλγών. Ωστόσο, λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων τόσο για την παραγωγή των υπερήχων, όσο και για την ψύξη του συστήματος, η εφαρμογή της σε μεγάλη κλίμακα είναι περιορισμένη [9].

5.2.1.3 Επεξεργασία με σφαιρόμυλο

Η μέθοδος των σφαιρόμυλων είναι πολύ απλή και η κυτταρική διάρρηξη επιτυγχάνεται από την ανακίνηση ενός δοχείου το οποίο πληρούται από βιομάζα και γυάλινα ή μεταλλικά σφαιρίδια [9]. Η διάτρηση των κυττάρων οφείλεται στην τριβή και στις διατμητικές τάσεις που αναπτύσσονται κατά την μεταφορά ενέργειας από τα σφαιρίδια στα κύτταρα. Υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της μεθόδου, όπως το σχήμα του δοχείου, ο ρυθμός ανακίνησης, το μέγεθος, τα χαρακτηριστικά και η ποσότητα των σφαιριδίων. Επί παραδείγματι, σφαιρίδια διαμέτρου μικρότερης των 0.5 mm έχουν θετική επίδραση στην απόδοση της μεθόδου, σε αντίθεση με σφαιρίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Επίσης, σφαιρίδια μικρής πυκνότητας είναι καταλληλότερα για μέσα καλλιέργειας χαμηλού ιξώδους, ενώ αυτά με μεγαλύτερη πυκνότητα προτιμώνται για μέσα καλλιέργειας υψηλότερου ιξώδους. Οι παράγοντες αυτοί πέραν της απόδοσης της διάτρησης, επηρεάζουν και την κατανάλωση ενέργειας της διεργασίας. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η απλότητα του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται και η γρήγορη επεξεργασία της βιομάζας καθώς δεν απαιτείται προεπεξεργασία και η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί *in situ* [9]. Στην αντίθετα πλευρά, τα μειονεκτήματα σχετίζονται με την πολύ υψηλή κατανάλωση ενέργειας. Η μεταφορά ενέργειας από τα σφαιρίδια στα κύτταρα δεν είναι πάντα επαρκής, ενώ η υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται λόγω των τριβών, προϋποθέτουν τη χρήση ενός

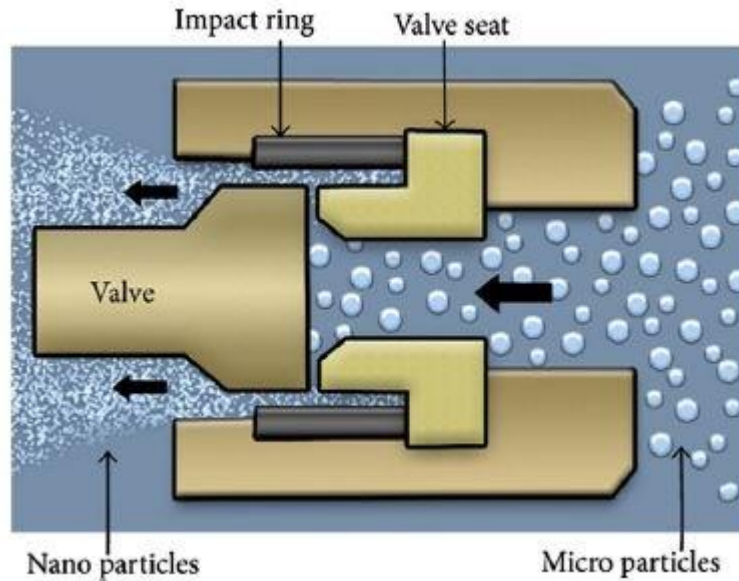
ιδιαίτερα ενεργοβόρου συστήματος ψύξης ώστε να περιοριστούν τα φαινόμενα θερμικής διάσπασης ευαίσθητων συστατικών. Επιπλέον, η μέθοδος στερείται εκλεκτικότητας καθώς μετά τη διάτρηση του τοιχώματος τα ενδοκυτταρικά συστατικά σχηματίζουν μία ρευστή μάζα η οποία απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία για το διαχωρισμό των επιθυμητών συστατικών. Για τους λόγους αυτούς, η επεξεργασία με σφαιρόμυλους χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία κυττάρων με ιδιαίτερα ανθεκτικό κυτταρικό τοίχωμα [45].



Εικόνα 10. Ενδεικτικό σχεδιάγραμμα σφαιρόμυλου. Πηγή: [AGT-Mining [Internet], 2014 http://www.agt.cl/mining/doc/6_dmq_mill.pdf.]

5.2.1.4 Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην υδραυλική διατμητική τάση που δημιουργείται όταν η βιομάζα, που βρίσκεται σε υδαρή φάση, περνάει με τη βοήθεια αντλίας υπό υψηλή πίεση διαμέσου ενός στομίου βαλβίδας και καταλήγει σε ένα θάλαμο χαμηλής πίεσης. Η διάτρηση επιτυγχάνεται από τη συνεχόμενη πρόσκρουση των κυττάρων στην επιφάνεια της βαλβίδας και την πτώση πίεσης που δημιουργείται [9]. Οι λειτουργικές παράμετροι της μεθόδου είναι τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της αντλίας και του θαλάμου, η θερμοκρασία και ο αριθμός των επαναλήψεων της διαδικασίας [46]. Χαρακτηρίζεται από πολλά πλεονεκτήματα όπως η ελάχιστη ποσότητα θερμότητας που δημιουργείται με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η χρήση συστήματος ψύξης αλλά και ο κίνδυνος θερμικής αποικοδόμησης. Η μέθοδος αυτή θεωρείται από της πιο αποδοτικές και δύναται να χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Παρά τα πλεονεκτήματα της, η διάσπαση κυττάρων με ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις απαιτεί αρκετό χρόνο καθώς και σημαντική ποσότητα ενέργειας [9].



Εικόνα 11. Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις. [46]

5.2.1.5 Ηλεκτρομετασχηματισμός

Ηλεκτρομετασχηματισμός είναι η αποδιοργάνωση των μορίων της κυτταρικής μεμβράνης λόγω διπολικής ροπής, όταν η βιομάζα εκτεθεί σε μαγνητικό πεδίο. Η εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικού πεδίου κατάλληλης έντασης στα κύτταρα οδηγεί στο σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι κλείνουν όταν απομακρυνθεί το ΗΠ. Ωστόσο, ένα πεδίο μεγαλύτερης έντασης καταστρέφει ανεπανόρθωτα την κυτταρική μεμβράνη και τα κύτταρα διαρρηγνύονται. Το μέγεθος του κυττάρου παίζει σημαντικό ρόλο και καθορίζει την ένταση του πεδίου. Ο ηλεκτρομετασχηματισμός είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την εξαγωγή ελαίων από μικροάλγη, καθώς είναι απλή μέθοδος και χρησιμοποιεί απευθείας την ηλεκτρική ενέργεια για τη δημιουργία του πεδίου [9]. Από την άλλη μεριά, εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς στην εφαρμογή της, καθώς απαιτεί διαλύματα που δεν περιέχουν ελεύθερα ιόντα, ελαττώνοντας έτσι το φάσμα των μικροαλγών που μπορεί να επεξεργαστεί. Ακόμη, αν και η μέθοδος δε βασίζεται στην ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών για τη διάτρηση των κυττάρων, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας που προκαλεί, μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα των ενδοκυτταρικών συστατικών [44].

5.2.1.6 Κατάψυξη

Μια επιπλέον μέθοδος που θα μπορούσε κανείς να συμπεριλάβει στις μεθόδους κυτταρικής διάσπασης είναι η ξήρανση με κατάψυξη (freeze-drying) κατά την οποία επέρχεται και διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης. Η μέθοδος αυτή ενισχύει την εκχύλιση των συστατικών καθώς κατά την διαδικασία της κατάψυξης οδηγεί στο σχηματισμό κρυστάλλων στα κύτταρα καθιστώντας με αυτό τον τρόπο πιο πορώδες το κυτταρικό τοίχωμα. Κατά την ξήρανση με κατάψυξη, πρώτο στάδιο αποτελεί η κατάψυξη των κυττάρων και στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε χαμηλή πίεση (περίπου 1 kPa και θερμοκρασίες περίπου 40 °C κατά την οποία οι κρύσταλλοι εξαχνώνονται. Ωστόσο,

προκειμένου να προκληθεί διάσπαση θα πρέπει η κατάψυξη να πραγματοποιηθεί με αργούς ρυθμούς καθώς έτσι επιτυγχάνεται η δημιουργία μεγαλύτερων κρυστάλλων. Η ξήρανση με κατάψυξη ανέκαθεν θεωρείται ως μια ασύμφορη μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης λόγω τους υψηλού κόστους λειτουργίας και συντήρησης [46].

5.2.1.7 Υπερκρίσιμα ρευστά

Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση υπερκρίσιμου CO₂ για την διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών. Η βιομάζα συγκεντρώνεται σε ένα θερμοστατούμενο δοχείο στο οποίο εφαρμόζεται υψηλή πίεση μέσω SCCO₂ για ορισμένο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, διακόπτοντας τη ροή του CO₂ το δοχείο αποσυμπιέζεται με αποτέλεσμα το σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Επειδή, δεν υπάρχει συνεχόμενη ροή CO₂ στο δοχείο, οι απώλειες ενδοκυτταρικών προϊόντων είναι σε πολύ μικρά ποσοστά. Λόγω της μη τοξικότητας του διοξειδίου του άνθρακα, η μέθοδος αποτελεί μια πολύ καλή επιλογή για την προεπεξεργασία των μικροαλγών. Επίσης, δεν αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες και έτσι δεν επηρεάζεται η ζωτικότητα θερμοευαίσθητων συστατικών. Στα μειονεκτήματα περιλαμβάνεται το κόστος του εξοπλισμού.

5.2.1.8 Χημικές μέθοδοι

Η κυτταρική μεμβράνη των μικροαλγών μπορεί να διασπαστεί κατόπιν επεξεργασίας με χημικές ουσίες όπως οξέα, βάσεις, τασιενεργές ουσίες οι οποίες μπορούν να αποδυναμώσουν τους δεσμούς που υφίστανται στο κυτταρικό τοίχωμα. Επιπρόσθετα, σε αυτή τη κατηγορία συγκαταλέγεται και η τεχνική του ωσμωτικού σοκ. Το βασικότερο πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση σε σχέση με τις μηχανικές, καθώς δεν απαιτούν μεγάλα ποσά θερμότητας ή ηλεκτρικής ενέργειας.

5.2.1.9 Χρήση χημικών ουσιών

Η διαπερατότητα του κυττάρου μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση ουσιών όπως (polymyxin, lysine polymers, protamine, polycationic peptides, cationic detergents) και όταν ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο ανώτατο όριο, το κύτταρο διασπάται. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν οξέα και βάσεις. Παρά την ικανοποιητική απόδοση που έχουν οι χημικές ουσίες στην κυτταρόλυση των μικροαλγών, εμφανίζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Τα χημικά που χρησιμοποιούνται πρέπει να καταναλώνονται συνεχώς, χωρίς να μένει ποσότητά τους σε περίσσεια, διότι διαβρώνουν τις επιφάνειες του αντιδραστήρα. Ακόμη, μπορεί να αντιδράσουν με τα προϊόντα που παράγονται δημιουργώντας πρόβλημα στη διαδικασία εξαγωγής των λιπιδίων [9].

5.2.1.10 Ωσμωτικό σοκ

Η τεχνική του ωσμωτικού σοκ προκαλεί τη διάσπαση του κυττάρου με την μεταβολή της συγκέντρωσης των αλάτων στο υγρό μέσο καλλιέργειας, μεταβάλλοντας έτσι την ωσμωτική πίεση εντός και εκτός κυτταρικού τοιχώματος. Υπάρχουν δυο είδη ωσμωτικών πιέσεων:

- **Hyper-osmotic stress:** όταν η συγκέντρωση των αλάτων είναι μεγαλύτερη στο εξωτερικό του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα τα κύτταρα συρρικνώνονται όταν τα ενδοκυτταρικά υγρά διαχέονται προς τα έξω προκαλώντας διάσπαση της μεμβράνης.
- **Hypo-osmotic stress:** όταν η συγκέντρωση των αλάτων είναι μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου. Νερό ρέει μέσα στα κύτταρα για την εξισορρόπηση της ωσμωτικής πίεσης, και τα κύτταρα διογκώνονται ή εκρήγνυνται, εάν η πίεση είναι πολύ υψηλή. Η εφαρμογή της είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω των πολύ μεγάλων απαιτήσεων σε νερό.

Από τις δυο μεθόδους, η πρώτη είναι αυτή που έχει εφαρμοστεί κατά κύριο λόγο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που υπάρχει. Η διάσπαση των κυττάρων με ωσμωτικό σοκ είναι απλή διαδικασία και έχει χαμηλό κόστος. Παρόλα αυτά, δεν έχει την αναμενόμενη απόδοση σε σχέση με άλλες μεθόδους, και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία αποβλήτων με υψηλή αλατότητα [9].

5.2.1.11 Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι αναφέρονται σε μεθόδους που αποικοδομούν το κυτταρικό περιβάλλον με τη χρήση ενζύμων. Αν και υπάρχουν άλλες βιολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούν βακτηριοφάγους στις περισσότερες περιπτώσεις βιολογικής διάσπασης κυττάρων χρησιμοποιούνται ένζυμα, επειδή τα ένζυμα είναι τα πιο εμπορικά διαθέσιμα και τα πιο εύκολα ελεγχόμενα βιολογικά υλικά. Τα πλεονεκτήματα των ενζυματικών μεθόδων είναι οι ήπιες συνθήκες αντιδράσεως και η υψηλή εκλεκτικότητα. Τα ένζυμα μπορεί να αποικοδομήσουν επιλεκτικά έναν χημικό δεσμό σε αντίθεση με τις μηχανικές μεθόδους που δεν εμφανίζουν τέτοια εκλεκτικότητα αλλά και τις χημικές μεθόδους που ενίοτε προκαλούν παράπλευρες αντιδράσεις των επιθυμητών προϊόντων. Ωστόσο, το μεγάλο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος των ενζύμων [9].

5.3 Σύνοψη μεθόδων διάρρηξης κυττάρου

Συνοπτικά, κάθε μέθοδος παρουσιάζει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι μηχανικές μέθοδοι προτιμούνται σε βιομηχανική κλίμακα, αν και έχουν υψηλή κατανάλωση ενέργειας. Οι μη μηχανικές μέθοδοι μπορεί να επηρεάζουν σε μικρό βαθμό την ποιότητα του τελικού προϊόντος, αλλά είναι λιγότερο ενεργοβόρες και εμφανίζουν υψηλότερη εκλεκτικότητα. Παρόλα αυτά, απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο επεξεργασίας, ενώ οι απαιτήσεις σε χημικά αυξάνουν το κόστος. Στον **Πίνακα 3**, παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων διάρρηξης του κυττάρου των μικροαλγών που περιγράφηκαν στην ενότητα αυτή.

Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων διάρρηξης κυττάρων.

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μικροκύματα	Απλή, αποδοτική, γρήγορη	Κίνδυνος θερμικής διάσπασης κυττάρων, απαιτεί σύστημα ψύξης
Υπέρηχοι	Αποδοτική	Ενεργοβόρος, απαιτεί σύστημα ψύξης
Επεξεργασία με σφαιρόμυλο	Απλή, γρήγορη	Ενεργοβόρος, απαιτεί σύστημα ψύξης, χαμηλή εκλεκτικότητα
Ομογενοποίηση σε υψηλές πιέσεις	Μειωμένος κίνδυνος θερμικής διάσπασης κυττάρων, αποδοτική	Αργή, Ενεργοβόρα
Ηλεκτρομετασχηματισμός	Απλή, εύκολη	Εφαρμογή σε απιονισμένα διαλύματα, κίνδυνος θερμικής διάσπασης κυττάρων
Κατάψυξη	Αποδοτική	Αργή, υψηλό λειτουργικό κόστος
Υπερκρίσιμα ρευστά	Μη τοξική, μειωμένος κίνδυνος θερμικής διάσπασης	Υψηλό πάγιο κόστος
Χημικές	Αποδοτικές	Κίνδυνος αντίδρασης με τα προϊόντα
Ωσμωτικό σοκ	Απλή, χαμηλό κόστος	Μη αποδοτική
Βιολογικές	Ήπιες συνθήκες, υψηλή εκλεκτικότητα	Υψηλό κόστος ενζύμων

6 Μέθοδοι εξαγωγής ενδοκυτταρικών προϊόντων

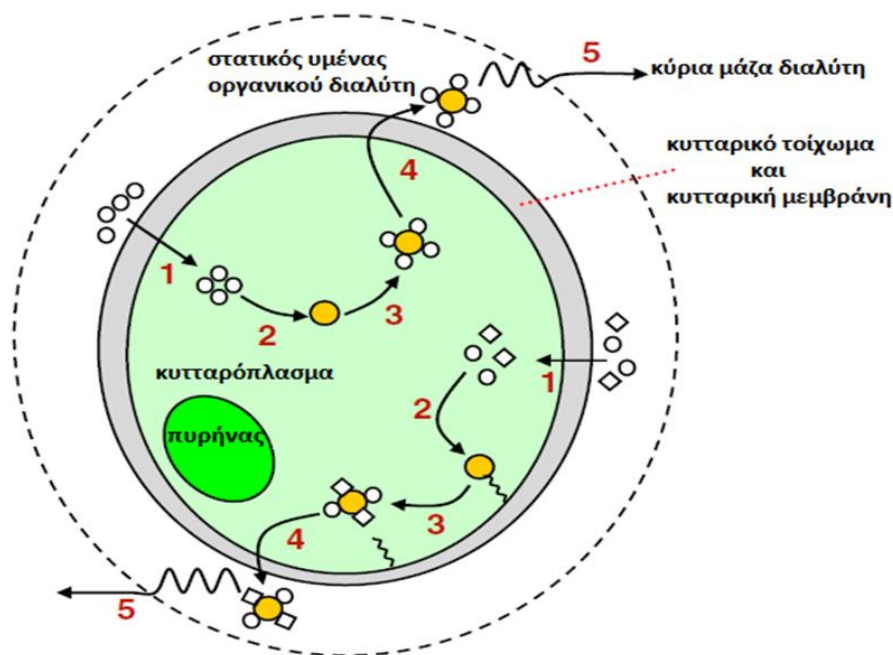
Στη φάση της εξαγωγής των ελαίων από το κύτταρο, η βιομάζα εκτίθεται σε ένα διαλύτη έκλουσης ο οποίος εξαγάγει τα λίπη από τις κυτταρικές μήτρες. Η βιομάζα στο στάδιο αυτό εξακολουθεί να περιέχει ορισμένη ποσότητα υγρασίας. Στις μεθόδους εξαγωγής χρησιμοποιούνται κυρίως είτε οργανικοί διαλύτες είτε υπερκρίσιμα ρευστά, όπως είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

6.1 Οργανικοί διαλύτες

Οι αρχές που διέπουν αυτή τη μέθοδο εξαγωγής ελαίων βασίζονται στο νόμο της Χημείας: «Τα όμοια διαλύουν όμοια». Λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδροφοβικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων, τα ουδέτερα λιπίδια συνδέονται με ασθενείς δεσμούς van der Waals μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σφαιρίδια στο κυτταρόπλασμα [47,48]. Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για τη λειτουργία του διαλύτη παρουσιάζεται στο σχήμα 1 και χωρίζεται σε 5 βήματα. Όταν ένα κύτταρο αλγών εκτεθεί σε μη πολικό οργανικό διαλύτη, όπως το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο, ο διαλύτης εισχωρεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα (βήμα 1) όπου αλληλεπιδρά με τα ουδέτερα λιπίδια μέσω δυνάμεων van der Waals (βήμα 2) προς σχηματισμό συμπλέγματος οργανικού διαλύτη-λιπιδίων (βήμα 3). Το σύμπλεγμα αυτό, λόγω της βαθμίδας συγκέντρωσης, διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (βήμα 4) και το στατικό φιλμ του οργανικού διαλύτη περιβάλλει το κύτταρο (βήμα 5) μέσα στην κύρια συγκέντρωση αυτού. Σαν συνέπεια, τα ουδέτερα λιπίδια εξάγονται από το κύτταρο και παραμένουν αδιάλυτα στον μη πολικό οργανικό διαλύτη. Το στατικό φιλμ δημιουργείται λόγω της αλληλεπίδρασης του οργανικού διαλύτη και του κυτταρικού τοιχώματος. Το φιλμ αυτό περιβάλλει το κύτταρο και παραμένει αμετάβλητο από οποιοδήποτε ροή διαλύτη ή από διαταραχή [44].

Ωστόσο, κάποια ουδέτερα λιπίδια εντοπίζονται ως συμπλέγματα με πολικά λιπίδια στο κυτταρόπλασμα. Το σύμπλεγμα αυτό είναι ισχυρά συνδεδεμένο μέσω δεσμών υδρογόνου με πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ του μη πολικού οργανικού διαλύτη και των ουδέτερων λιπιδίων του συμπλέγματος είναι ανίσχυρες να διαταράξουν αυτούς τους συνδυασμούς λιπιδίων-πρωτεϊνών της μεμβράνης. Από την άλλη, πολικοί οργανικοί διαλύτες (ισοπροπανόλη ή μεθανόλη) μπορούν να διαταράξουν τα συμπλέγματα αυτά, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με πολικά λιπίδια του συμπλέγματος [47,48]. Ο μηχανισμός κατά τον οποίο μίγμα μη πολικού-πολικού οργανικού διαλύτη χρησιμοποιείται για την εξαγωγή συμπλεγμάτων λιπιδίων που βρίσκονται στην μεμβράνη παρουσιάζεται στο χαμηλότερο τμήμα του σχήματος και διαχωρίζεται επίσης σε πέντε βήματα. Το μίγμα διαλυτών διεισδύει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα (βήμα 1) όπου αλληλεπιδρά με σύμπλεγμα λιπιδίων (βήμα 2). Κατά την αλληλεπίδραση, ο μη πολικός οργανικός διαλύτης περιβάλλει το σύμπλεγμα των λιπιδίων και σχηματίζει δεσμούς van der Waals με τα ουδέτερα λιπίδια του συμπλέγματος, ενώ ο πολικός οργανικός διαλύτης περιβάλλει επίσης το σύμπλεγμα των λιπιδίων αλλά σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα πολικά λιπίδια αυτού. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι αρκετά ισχυροί ώστε να μετακινήσουν τους σχηματισμούς λιπιδίων-πρωτεϊνών συνδέοντας τα λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη. Ένα

σύμπλεγμα οργανικού διαλύτη-λιπιδίων δημιουργείται και διαχωρίζεται από την κυτταρική μεμβράνη (βήμα 3). Το σύμπλεγμα αυτό διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (βήμα 4) και ένα στατικό φιλμ οργανικού διαλύτη περιβάλλει το κύτταρο (βήμα 5) μέσα στην κύρια μάζα του διαλύτη. Επομένως, η προσθήκη ενός πολικού οργανικού διαλύτη σε ένα μη πολικό διευκολύνει την εξαγωγή των συμπλεγμάτων των ουδέτερων λιπιδίων που εδράζονται στη μεμβράνη. Ωστόσο, η διαδικασία αναπόφευκτα οδηγεί στην ταυτόχρονη εξαγωγή και των πολικών λιπιδίων [44].

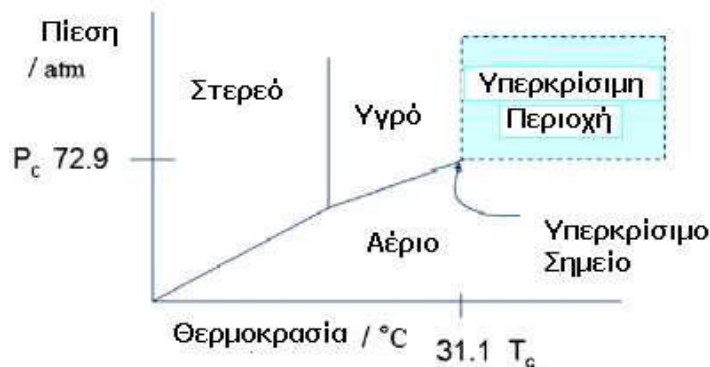


Σχήμα 2. Σχηματικό διάγραμμα των μηχανισμών δράσης του οργανικού διαλύτη. [44]

Όταν χρησιμοποιείται μίγμα πολικού/μη πολικού οργανικού διαλύτη (όπως εξάνιο/ισοπροπανόλη ή χλωροφόρμιο/μεθανόλη) όλοι οι διαλύτες προστίθενται ταυτόχρονα στη βιομάζα στην απαιτούμενη ογκομετρική αναλογία. Καθώς τα υπολείμματα των κυττάρων απομακρύνονται με μέθοδο διαχωρισμού υγρού-στερεού (όπως η διήθηση), ο διφασικός διαχωρισμός του αρχικά μονοφασικού οργανικού μίγματος προκαλείται με την απότομη ισοογκομετρική προσθήκη του μη πολικού οργανικού διαλύτη και του νερού. Κατά την ολοκλήρωση του διφασικού διαχωρισμού τα ουδέτερα και πολικά λιπίδια θα συνεχίσουν να αποτελούν μέρος της οργανικής φάσης (μίγμα μη πολικού οργανικού διαλύτη και πολικού οργανικού διαλύτη), ενώ η υδατική φάση (μίγμα νερού και πολικού οργανικού διαλύτη) θα περιέχει πρωτίστως ανταγωνιστικά των λιπιδίων μόρια (πρωτεΐνες και υδατάνθρακες) [47,48]. Επομένως μέσω του διφασικού διαχωρισμού επιτυγχάνεται όχι μόνο η απομάκρυνση του υπολείμματος του νερού αλλά και των ανταγωνιστών των λιπιδίων από το μίγμα οργανικού διαλύτη-λιπιδίων. Η οργανική φάση μεταγγίζεται και υφίσταται εξάτμιση ώστε να παραληφθούν ανεπεξέργαστα και χωρίς υγρασία λιπίδια, τα οποία θα κλασματοποιηθούν και θα υποστούν μετεστεροποίηση [44].

6.2 Υπερκρίσιμη εκχύλιση

Όταν η θερμοκρασία και η πίεση ενός ρευστού αυξάνονται πάνω από τις κρίσιμες τιμές (T_c , P_c), τότε το ρευστό εισέρχεται στην υπερκρίσιμη περιοχή (σχήμα 10) [49,50,51].



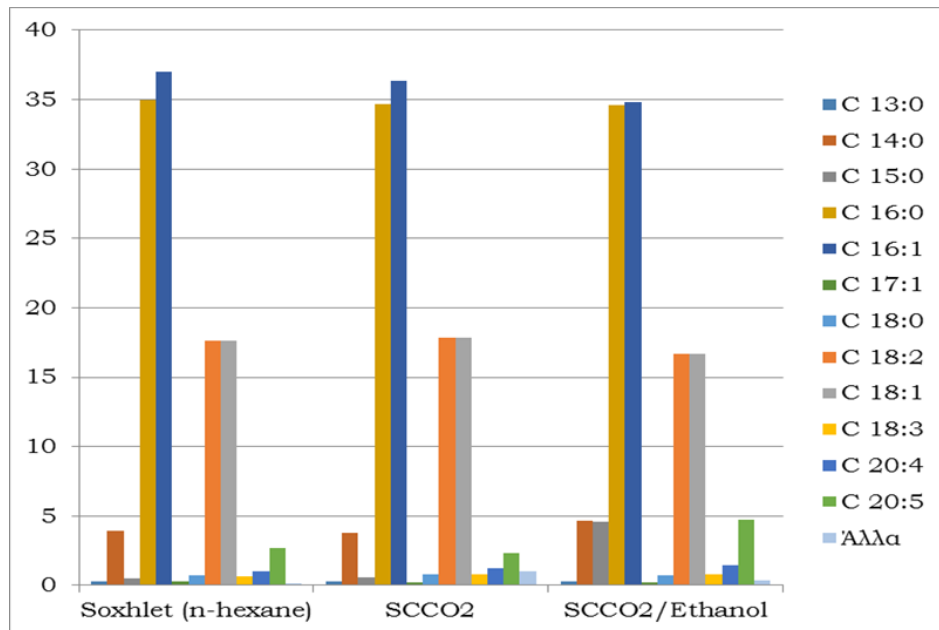
Σχήμα 3. Διάγραμμα φάσεων P-T για το διοξείδιο του άνθρακα. [44]

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μια συνεχώς ανερχόμενη πράσινη τεχνολογία που τείνει να αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες. Πολλές μελέτες εφαρμογής της τεχνολογίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης έχουν πραγματοποιηθεί και καταδεικνύουν την υπεροχή της για την ανάκτηση φυσικών συστατικών από φυτικές πρώτες ύλες [52-60]. Λόγω του χαμηλού ιξώδους και της υψηλής διαχυτότητας, το ρευστό έχει καλύτερες ιδιότητες φαινομένων μεταφοράς από ένα υγρό. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η πυκνότητα του ρευστού αλλάζει μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία και την πίεση του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η διαλυτική ικανότητα του, καθώς εξαρτάται από την πυκνότητα [61].

Το υπερκρίσιμο CO_2 είναι κατάλληλος διαλύτης εξαγωγής ενδοκυτταρικών συστατικών από τη βιομάζα των μικροαλγών καθώς παρουσιάζει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

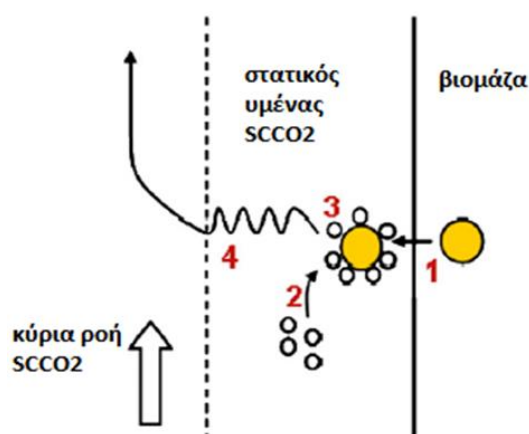
- Ρυθμιζόμενη ισχύς: Η ισχύς του διαλύτη (υπερκρίσιμου ρευστού) είναι συνάρτηση της πυκνότητας, η οποία μπορεί συνεχώς να προσαρμόζεται στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της πίεσης εξαγωγής. Επομένως, η ισχύς αυτή μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να αλληλεπιδρά πρωταρχικά με τα ουδέτερα λιπίδια.
- Μεταφορά μάζας: λόγω των φυσικών του ιδιοτήτων (μεταξύ υγρού και αερίου), το ρευστό διεισδύει ταχύτατα στο εσωτερικό των κυττάρων με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη εξαγωγή λιπιδίων σε μικρότερο χρόνο.
- Καθαρότητα εξαγόμενων προϊόντων: τα λιπίδια που εξαγονται με τη μέθοδο του υπερκρίσιμου ρευστού δεν περιέχουν διαλύτη. Για τον λόγο αυτό δε χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία για την απομάκρυνση του.
- Ιδιοτήτων SCCO_2 : χαμηλή τοξικότητα και ευφλεκτότητα, και χημική αδράνεια.

Από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε μικροάλγη για τη σύγκριση της υπερκρίσιμης εκχύλισης με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης [62,63] προκύπτει ότι οι αποδόσεις της υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι παρόμοιες με εκείνες της εκχύλισης με εξάνιο. Τυπικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 1. Σύσταση εκχυλισμένων λιπαρών οξέων του μικροάλγους *Nannochloropsis sp* μετά από εκχύλιση με Soxhlet και SCCO₂. [63]

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, το SCCO₂ έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της βιομάζας και εκροφά τα λιπίδια από το εσωτερικό των κυττάρων. Αμέσως μετά τη διάλυση, το SCCO₂ περικλείει τα λιπίδια και δημιουργεί ένα σύμπλεγμα SCCO₂- λιπιδίων. Το σύμπλεγμα λόγω δυναμικού συγκέντρωσης, διαχέεται στον στατικό υμένα και εισέρχεται στην κύρια ροή του ρευστού (Σχήμα 3).

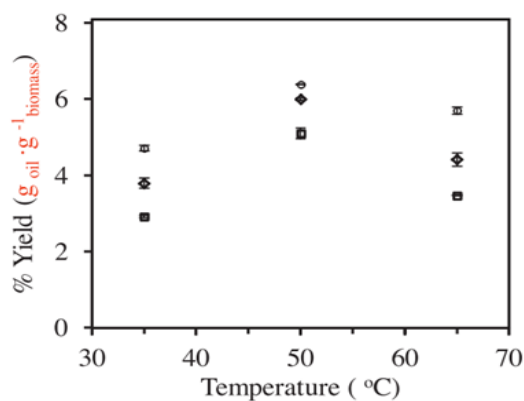


Σχήμα 4. Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού υπερκρίσιμης εκχύλισης. [44]

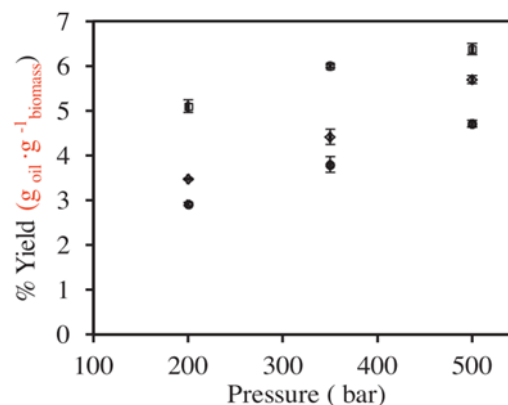
Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα αποσυμπιέζεται με αποτέλεσμα το CO₂ να επιστρέφει στην αέρια φάση και τα λιπίδια να περισυλλέγονται. Έτσι, τα λιπίδια απαλλαγμένα από το διαλύτη δε χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία [44].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι η πίεση, η θερμοκρασία, η ογκομετρική ροή του CO₂, ο χρόνος εκχύλισης και η προεπεξεργασία της καλλιέργειας.

Μελέτες έδειξαν πως η αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας εκχύλισης αυξάνει και την ανάκτηση λιπιδίων και ακόρεστων λιπαρών οξέων [61]. Όπως, φαίνεται και στα **Διαγράμματα 2 και 3**, αύξηση της θερμοκρασίας με σταθερή την πίεση μέχρι τους 50 °C αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, αλλά περαιτέρω αύξηση παρουσιάζει αντίθετα αποτελέσματα. Από την άλλη μεριά, όσο αυξάνεται η πίεση υπό σταθερή θερμοκρασία τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των λιπιδίων που λαμβάνονται από την εκχύλιση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυξάνεται η διαλυτότητα των κυτταρικών συστατικών στον διαλύτη (CO₂) αφού μειώνεται η πυκνότητά του [64].

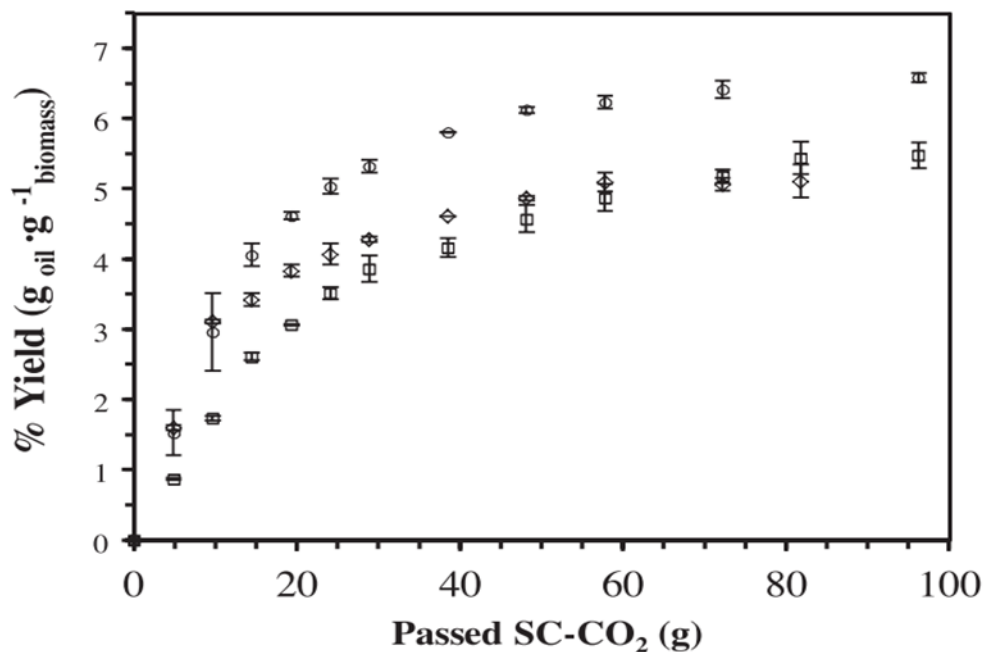


Διάγραμμα 2. Επίπτωση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂ σε *Scenedesmus sp.* [64]



Διάγραμμα 3. Επίπτωση της πίεσης εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂ σε *Scenedesmus sp.* [64]

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η επίδραση του μεγέθους των κυττάρων του μικροόλγους *Scenedesmus sp.* στη απόδοση της εκχύλισης με SCCO₂. Μείωση του μεγέθους των κυττάρων αυξάνει την ειδική επιφάνεια και ενισχύει την επαφή του CO₂ με τα ευδιάλυτα συστατικά του.



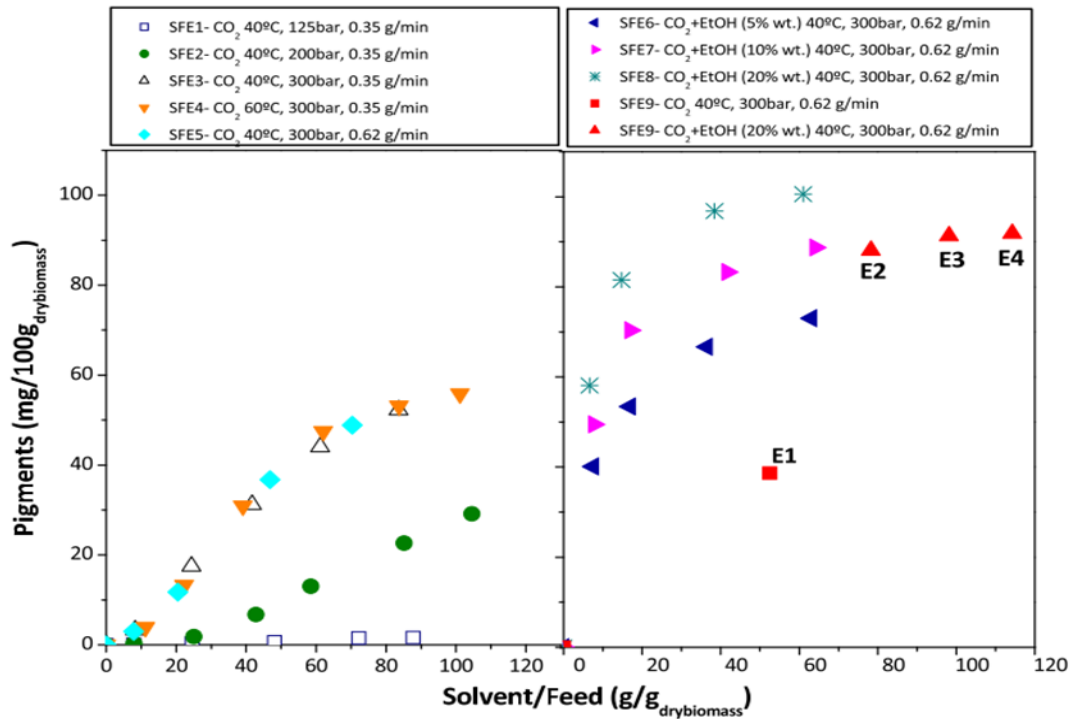
Διάγραμμα 4. Επιπτώσεις της προεπεξεργασίας της βιομάζας (*Scenedesmus* sp.) στην απόδοση της εκχύλισης (□ untreated-grinded, ◇ lyophilized-ungrinded και ○ lyophilized-grinded) στους 50 °C, 500 bar και ροή CO₂ 2,88 g/min [64]

Είναι φανερό ότι η βιομάζα που έχει υποστεί μεγαλύτερη επεξεργασία (lyophilized-grinded) παρουσιάζει υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης.

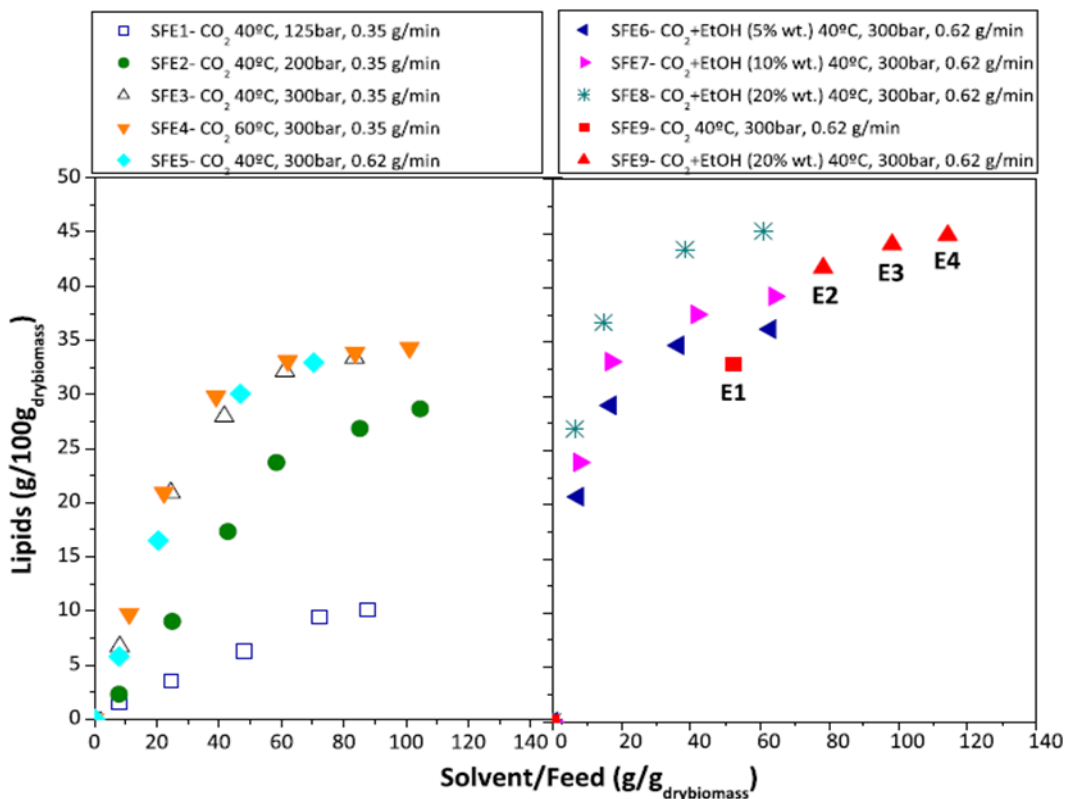
Για τη βελτίωση της εκχύλισης των πολικών λιπιδίων και άλλων πολικών ουσιών με σημαντική προστιθέμενη αξία η πολικότητα του CO₂ μπορεί να μεταβληθεί με χρήση συνδιαλυτών όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, ή ακόμα και το νερό. Σε αρκετές έρευνες αναφέρεται ότι η διαλυτότητα των λιπιδίων σε SC-CO₂ αυξάνεται σημαντικά με την προσθήκη αιθανόλης, με αποτέλεσμα τα φωσφολιπίδια να εκχυλίζονται σε επίπεδα ευθέως ανάλογα με την προστιθέμενη αιθανόλη.

Τυπικά αποτελέσματα εκχύλισης λιπιδίων και χρωστικών από μικροάλγη με χρήση SC-CO₂ παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 5** και **6**.

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση εμφανίζει υψηλά ποσοστά απόδοσης, σημαντική εκλεκτικότητα, ενώ ταυτόχρονα είναι μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, καθώς ελαχιστοποιεί τη χρήση οργανικών διαλυτών. Παρόλα αυτά, έχει υψηλό πάγιο κόστος και οι εφαρμογές της συνήθως εντοπίζονται είτε σε μονάδες πολύ μεγάλης δυναμικότητας (προϊόντα μεγάλης εμπορευσιμότητας) είτε σε μικρής δυναμικότητας μονάδες που παράγουν προϊόντα πολύ υψηλής προστιθέμενης αξίας (αιθέρια έλαια, χρωστικές, δραστικές ουσίες κ.ά. φυσικά προϊόντα) για χρήση σε βιομηχανίες τροφίμων, αρωμάτων και φαρμάκων.



Διάγραμμα 5. Βιβλιογραφικά πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης λιπιδίων από το στέλεχος *Nannochloropsis sp.* για τις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες [65]



Διάγραμμα 6. Βιβλιογραφικά πειραματικά αποτελέσματα ανάκτησης χρωστικών από το στέλεχος *Nannochloropsis sp.* για τις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες [65].

6.3 Σύγκριση μεταξύ οργανικών διαλυτών και υπερκρίσιμου SCCO₂

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή ελαίων έχουν η καθεμία τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της.

Αν και έχει χαμηλή δραστικότητα και είναι αποτελεσματική όταν εφαρμόζεται σε νωπή βιομάζα, η μέθοδος των οργανικών διαλυτών είναι αργή και χρησιμοποιεί μεγάλες ποσότητες από τοξικούς και ακριβούς διαλύτες. Έχει περιορισμένη εκλεκτικότητα όσο αφορά τα επιθυμητά προϊόντα για την παραγωγή βιοντίζελ, ενώ ο διαχωρισμός των διαλυτών από τα λιπίδια είναι ιδιαίτερα ενεργοβόρος.

Από την άλλη μεριά, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO₂ είναι γρήγορη και μη τοξική. Έχει υψηλή εκλεκτικότητα στα επιθυμητά προϊόντα λόγω της προσαρμοζόμενης πυκνότητας του διαλύτη στις μεταβολές της πίεσης και της θερμοκρασίας. Δεν αντιδρά με τα λιπίδια και παραμένει αποτελεσματική όταν εφαρμόζεται σε υγρή βιομάζα. Ωστόσο, υψηλά ποσοστά υγρασίας εμποδίζουν την ροή του διαλύτη και δημιουργούν προβλήματα εμφράξεων στο σύστημα σωληνώσεων. Τα κυριότερα προβλήματα της μεθόδου για την ανάπτυξή της σε βιομηχανική κλίμακα εντοπίζονται στο υψηλό πάγιο κόστος και στις ενεργειακές απαιτήσεις για τη λειτουργία του συστήματος [44].

Στην περίπτωση των μικροαλγών, όπου η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνει την απόδοση της ανάκτησης, η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση πλεονεκτεί αφού στην ίδια συσκευή/ διάταξη μπορούν διαδοχικά να γίνουν και οι δύο διεργασίες (διάρρηξη κυτταρικής μεμβράνης και ανάκτηση ενδοκυτταρικών προϊόντων).

7 Πειραματικές διατάξεις

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις της παρούσας εργασίας. Οι διαδικασίες μέτρησης και τα αποτελέσματα θα περιγραφούν στα επόμενα κεφάλαια.

7.1 Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE-500

Τα πειράματα της υπερκρίσιμης εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν στην εργαστηριακή συσκευή SFE- 500 (SEPAREX CHIMIE FINE, France) που είναι κατάλληλη για επεξεργασία τόσο στερεών όσο και υγρών υλικών, μέσω μιας διεργασίας διαλείποντος έργου.



Εικόνα 12. Συσκευή Separex SFE 500.

Η συσκευή αποτελείται από ένα εκχυλιστήρα, όγκου 500 ml, εντός του οποίου τοποθετείται κυλινδρικό δοχείο με πορώδεις μεταλλικούς δίσκους (PORAL κλάση 30) στο πάνω και στο κάτω μέρος του και όγκου 400 ml, στο οποίο εισάγεται το προς εκχύλιση δείγμα. Το δοχείο κλείνει αεροστεγώς μέσω ενός εμβόλου, που φέρει για το σκοπό αυτό ένα μεταλλικό δαχτυλίδι, ένα δαχτυλίδι από PTFE και μια κατάλληλη βίδα.

Η συσκευή αποτελείται επίσης από δύο διαχωριστήρες, που λειτουργούν σε διαφορετικές πιέσεις και έχουν όγκο 18 ml το καθένα. Κατά τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η παραλαβή προϊόντων διαφορετικής σύστασης. Εξωτερικά είναι σχεδιασμένα σαν κυκλώνες, ώστε το ρευστό να εισέρχεται εφαιπτομενικά ως προς τα τοιχώματα του θαλάμου και να επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του εκχυλίσματος με τη μικρότερη δυνατή παράσυρση.

Τόσο ο εκχυλιστήρας όσο και οι δύο διαχωριστήρες φέρουν διπλά τοιχώματα στα οποία ρέει νερό και μέσω αυτού επιτυγχάνεται η θερμοστάτησή τους στην επιθυμητή θερμοκρασία. Μάλιστα, η μέγιστη πίεση και θερμοκρασία λειτουργίας τους φτάνει τα 300 bar και τους 70 °C αντίστοιχα. Επίσης, κάθε δοχείο διαθέτει ασφαλιστικό πίεσης για τη διασφάλιση της σωστής και ασφαλούς λειτουργίας του.

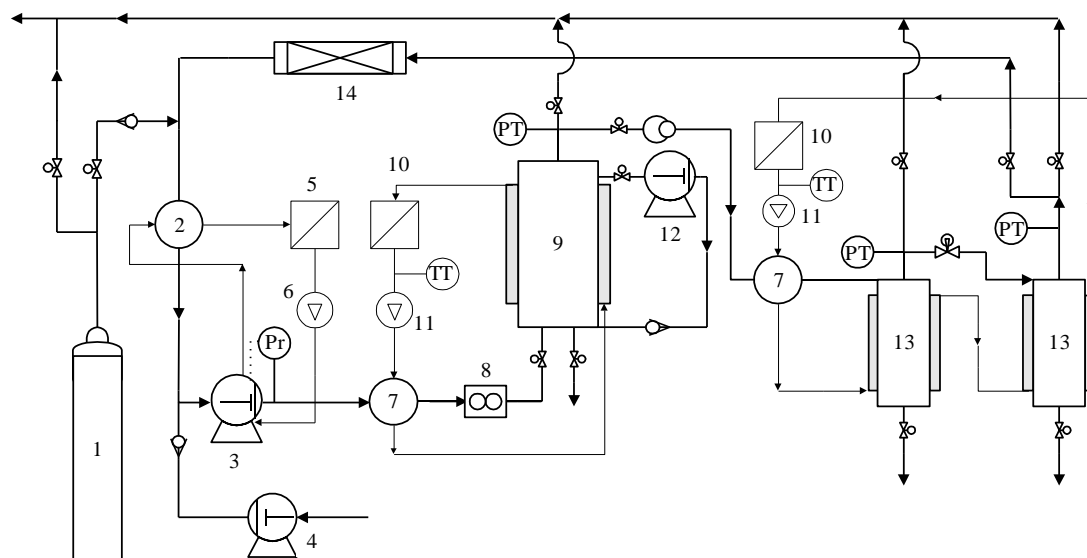
Αναλυτικότερα, το CO₂ της φιάλης οδηγείται σε μια αντλία μεμβράνης υψηλής πίεσης για τη συμπίεση του, αφού πρώτα ψυχθεί σε ένα κατά αντιρροή εναλλάκτη. Ειδικότερα το σύστημα ψύξης περιλαμβάνει μια ψυκτική μονάδα (LAUDA UKT600P), η οποία τροφοδοτεί τον εναλλάκτη με μίγμα νερού- γλυκόλης, ενώ επιπλέον ψύχει τις κεφαλές της αντλίας υψηλής πίεσης. Στόχος της διπλής αυτής ψύξης είναι η αποφυγή του φαινομένου της σπηλαιώσης στην αντλία. Στην περίπτωση χρήσης συνδιαλύτη, η προσθήκη του στο CO₂ γίνεται με μια αντλία εμβόλου πριν τη συμπίεση του τελευταίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί θέρμανση σε ένα κατά αντιρροή εναλλάκτη με θερμαντικό μέσο νερό. Έτσι, σε υπερκρίσιμη πλέον κατάσταση το CO₂ περνώντας από ένα ροόμετρο οδηγείται στον εκχυλιστήρα με φορά από κάτω προς τα πάνω. Η πίεση στον εκχυλιστήρα ρυθμίζεται μέσω ενός ρυθμιστή πίεσης, ενώ αν είναι επιθυμητός ο κορεσμός του CO₂ με την προς εκχύλιση ουσία, είναι δυνατή η ανακυκλοφορία του στο δοχείο εκχύλισης μέσω μιας πνευματικής αντλίας.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά μεγέθη της μονάδας υπερκρίσιμης εκχύλισης.

Μέγιστη πίεση λειτουργίας	300 bar
Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας	70°C
Θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας ψυκτικού	-25°C to 40 °C
Ροή διαλύτη	0.5-5 kg/h
Ροή συνδιαλύτη	0-10 ml/min
Όγκος δοχείου εκχύλισης	400 ml
Όγκος κάθε διαχωριστήρα	18 ml
Αντλία ανακυκλοφορίας	χωρητικότητα: 0.6 ml βαθμός συμπίεσης: 110
Υλικά	316L ανοξείδωτος χάλυβας, PTFE

Ακολούθως, το CO₂ μαζί με το εκχύλισμα εκτονώνεται στους διαχωριστήρες που λειτουργούν σε διαφορετικές πιέσεις. Η γραμμή εκτόνωσης θερμαίνεται με ένα εναλλάκτη για να αποφευχθεί η δημιουργία πάγου στο σωλήνα και σαν αποτέλεσμα το κλείσιμο της γραμμής εξαιτίας της μεγάλης πτώσης θερμοκρασίας κατά την εκτόνωση. Όσο αναφορά την πίεση, στο πρώτο δοχείο διαχωρισμού, αυτή ρυθμίζεται με τη βοήθεια ενός βελονοειδή ρυθμιστή, ενώ στο δεύτερο η πίεση

εξαρτάται από το αν το CO₂ ανακυκλώνεται ή όχι. Στην πρώτη περίπτωση η πίεση είναι ίση με εκείνη της φιάλης CO₂, ενώ στη δεύτερη αυτό οδηγείται στην ατμόσφαιρα, οπότε έχει αντίστοιχη πίεση. Κατά την ανακύκλωση του CO₂, αυτό διέρχεται πρώτα από ένα φίλτρο ενεργού άνθρακα, ώστε να συγκρατηθούν τυχόν ουσίες που έχουν παρασυρθεί ή παραμένουν διαλυμένες σε αυτό.



Διάγραμμα 7. Διάγραμμα ροής εργαστηριακής συσκευής (SFE-500). 1: φιάλη CO₂; 2: συμπυκνωτής; 3: αντλία CO₂; 4: αντλία συνδιαλύτη; 5: δοχείο ψυκτικού; 6: αντλία ψυκτικού; 7: θερμαντήρες; 8: μετρητής ροής μάζας; 9: εκχυλιστήρας; 10: λουτρό θέρμανσης; 11: αντλίες συστήματος θέρμανσης; 12: αντλία ανακυκλοφορίας; 13: διαχωριστήρες; 14: φίλτρο ενεργού άνθρακα; Pr: πρεσοστάτης; PT: μεταβιβαστής μέτρησης πίεσης, TT: μεταβιβαστής μέτρησης θερμοκρασίας.

7.2 Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SPA

Η συσκευή SPA (Sample Preparation Accessory, LDC Analytical), είναι σχεδιασμένη για να εκχυλίσει και καθαρίσει δείγματα. Μπορεί να απομονώσει καθαρά συστατικά ή μίγματα αναλυτών απευθείας από τις πρώτες ύλες. Τα χαρακτηριστικά μεγέθη της συσκευής παρουσιάζονται στον πίνακα.

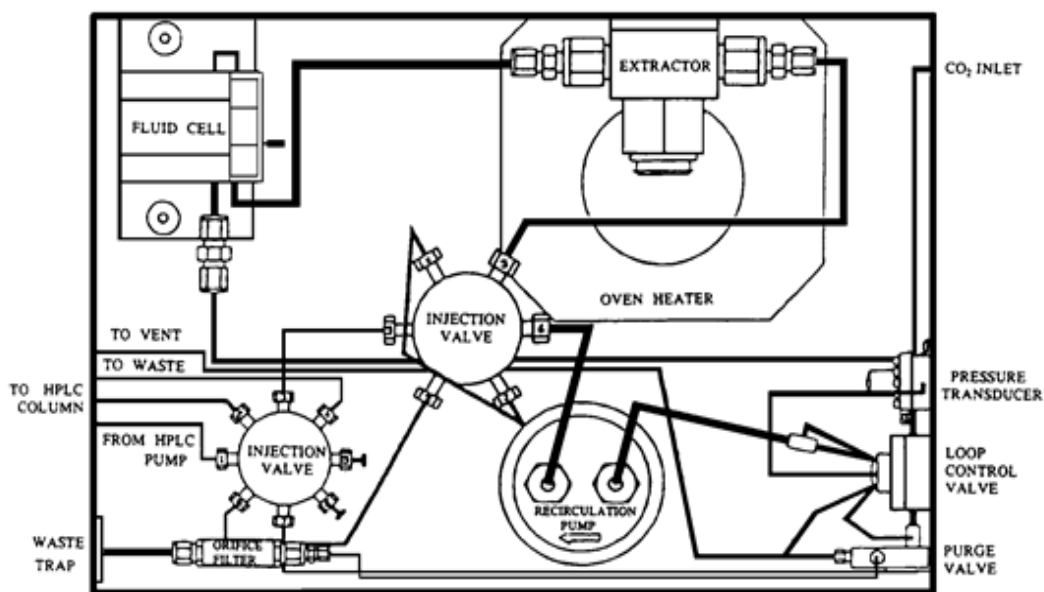
Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα εισάγεται σε ένα δοχείο εκχύλισης όγκου 5 mL από ανοξείδωτο χάλυβα, με πορώδεις μεταλλικούς δίσκους πάνω και κάτω. Το δοχείο στη συνέχεια τοποθετείται στον εκχυλιστήρα. Το CO₂, αφού πρώτα συμπιεστεί και θερμανθεί, διέρχεται στον βρόγχο που βρίσκεται εντός του φούρνου. Αρχικά ρέει από τη βαλβίδα ρύθμισης του βρόγχου στην αντλία ανακυκλοφορίας, και από εκεί στην εξάθυρη βαλβίδα εισαγωγής για να καταλήξει στον εκχυλιστήρα. Μετά τον εκχυλιστήρα, το ρεύμα του CO₂ περνάει από ένα κελί υψηλής πίεσης, το οποίο έχει ένα αισθητήρα UV με διάφορα μήκη κύματος, στο

οποίο παρακολουθείται η εκχύλιση καθώς ο βρόγχος εκχύλισης φτάνει στην επιθυμητή πίεση.



Εικόνα 13. Συσκευή SPA

Όταν αποκατασταθεί ισορροπία μεταξύ της εκχυλιζόμενης ουσίας και του υπερκρίσιμου ρευστού, το εκχύλιμα περνάει μέσω της εξάθυρης βαλβίδας στο φίλτρο εξαγωγής (orifice) και συλλέγεται.



Διάγραμμα 8. Διάγραμμα ροής συσκευής SPA

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά λειτουργίας συσκευής SPA.

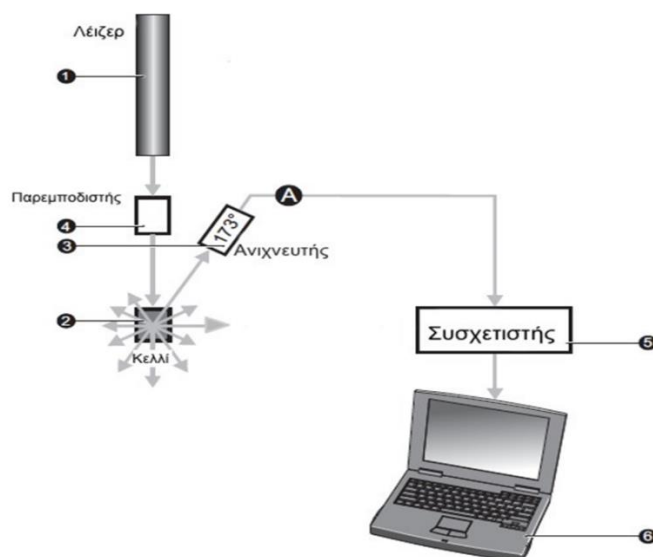
Οθόνη εκχύλισης	Εύρος μήκους κύματος	220-700 nm
Κελί υψηλής πίεσης	Όγκος	0.5 ml
	Ονομαστική πίεση	344 bar
Αντλία διαλύτη	Μέγιστη πίεση λειτουργίας	344 bar
	Ογκομετρική ροή	0.1-9.99 mL/min
Εκχυλιστήρας	Μέγιστη πίεση λειτουργίας	344 bar
	Μέγιστης θερμοκρασίας λειτουργίας	60°C
	Όγκος	5 mL
Αντλία ανακυκλοφορίας	Μέγιστη πίεση λειτουργίας	344 bar
	Θερμοκρασιακό εύρος λειτουργίας	-75°C to 135°C
Εγχύτης δείγματος	Όγκος	10 µL standard
	Συστοιχία Πνευματικών βαλβίδων	45-100 psig
Φούρνος	Θερμοκρασιακό εύρος	Θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι 90°C
Σύστημα ψύξης	Θερμοκρασιακό εύρος	Θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι -15°C

7.3 Μετρήσεις δυναμικού Zeta και διαμέτρου σωματιδίων

7.3.1 Οργανολογία μέτρησης μεγέθους σωματιδίων

Οι μετρήσεις διεξάγονται με τη συσκευή Zetasizer Nano ZS 173 της εταιρείας Malvern. Πρόκειται για ένα μηχάνημα το οποίο χρησιμοποιείται στην μέτρηση μεγέθους σωματιδίων, δυναμικού Z αλλά και μοριακού βάρους με γωνία διασποράς φωτός 173 μοιρών μέσω της τεχνολογίας δυναμικής διασποράς φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS). Μία τυπική διάταξη DLS αποτελείται από 6 κύρια μέρη. Αρχικά ένα laser (1) χρησιμοποιείται για την παροχή μιας πηγής φωτός για την ακτινοβολήση των σωματιδίων του δείγματος μέσα στο κελί (2). Το περισσότερο μέρος της ακτίνας laser διαπερνάει το δείγμα, αλλά ένα ποσοστό της διασκορπίζεται από τα σωματίδια εντός του δείγματος. Ένας ανιχνευτής (3) χρησιμοποιείται για την μέτρηση της έντασης του διαθλώμενου φωτός. Ένα σωματίδιο μπορεί να διασκορπίσει φως προς όλες τις κατευθύνσεις και έτσι, τουλάχιστον σε θεωρητικό επίπεδο, είναι δυνατόν να τοποθετηθεί ο ανιχνευτής σε οποιαδήποτε κατεύθυνση και να ανιχνεύσει τις διασκεδασμένες ακτίνες. Η ένταση του διασκεδασμένου φωτός πρέπει να βρίσκεται εντός ενός συγκεκριμένου εύρους έτσι ώστε ο ανιχνευτής να το μετρήσει επιτυχώς. Εάν ανιχνευτεί πολύ μεγαλύτερη

ποσότητα φωτός, τότε ο ανιχνευτής θα υπερφορτωθεί. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, ένας εξασθενητής (4) χρησιμοποιείται για να μειώσει την ένταση του laser και συνεπώς την ένταση του διασκορπισμού. Η κατάλληλη θέση για τον εξασθενητή ρυθμίζεται αυτόματα από το Zetasizer κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Το σήμα της έντασης του διασκορπισμένου φωτός που λαμβάνεται μέσω του ανιχνευτή προωθείται σε μια πλακέτα ψηφιακής επεξεργασίας που ονομάζεται συσχετιστής (5). Ο συσχετιστής συγκρίνει την ένταση της διασκόρπισης του φωτός σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα για να εξάγει σε μορφή δεδομένων τον ρυθμό τον οποίο ακολουθεί η διακύμανση της έντασης. Οι πληροφορίες από τον συσχετιστή προωθούνται στη συνέχεια στον υπολογιστή (6), όπου το ειδικό λογισμικό του Zetasizer αναλύει τα δεδομένα και εξάγει πληροφορίες για το μέγεθος των σωματιδίων. Σχηματικά η διάταξη έχει την εξής μορφή :



Σχήμα 5. Διάταξη συσκευής μέτρησης.

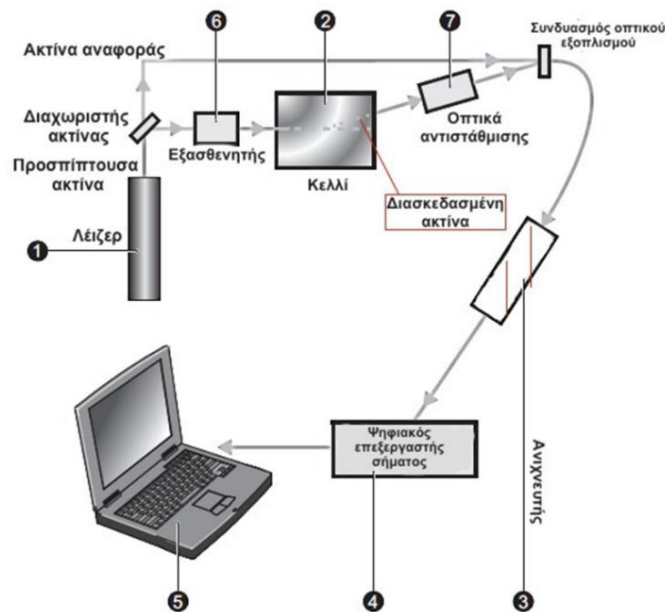
7.3.2 Οργανολογία μέτρησης δυναμικού Z (zeta potential)

Παρόμοια με την τυπική διάταξη DLS που περιγράφηκε στην μέτρηση μεγέθους σωματιδίων, το σύστημα μέτρησης δυναμικού Z αποτελείται από έξι κύρια στοιχεία. Αρχικά ένα laser (1) χρησιμοποιείται για την παροχή της φωτεινής πηγής η οποία θα ακτινοβολήσει τα σωματίδια εντός του δείγματος με τη διαφορά ότι στις μετρήσεις δυναμικού Z η ακτίνα αυτή διαχωρίζεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί μία προσπίπτουσα ακτίνα και μία ακτίνα αναφοράς. Η ακτίνα αναφοράς μορφοποιείται επίσης για να δημιουργηθεί απαραίτητως το φαινόμενο Doppler. Η ακτίνα laser περνάει από το κέντρο του κελιού (2) που περιέχει το δείγμα και ανιχνεύεται σκέδαση φωτός κατά 17 μοίρες. Κατά την εισαγωγή του κελιού στην υποδοχή, τα τερματικά του κελιού επιτρέπουν στο σύστημα να αναγνωρίσει τον τύπο του κελιού για τη μέτρηση δυναμικού Z που έχει εισαχθεί

και δίνεται η εντολή στο λογισμικό να χρησιμοποιηθεί η κατάλληλη μετρητική αλληλουχία. Όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο στο κελί, οποιαδήποτε μετακίνηση σωματιδίων εντός του μετρούμενου όγκου, έχει ως αποτέλεσμα τη διακύμανση της ανιχνευόμενης ακτινοβολίας με συχνότητα, η οποία είναι ανάλογη της ταχύτητας κίνησης των σωματιδίων. Έπειτα, ένας ανιχνευτής (3) αποστέλλει την πληροφορία αυτή σε έναν ψηφιακό μετρητή σήματος (4) και στη συνέχεια στον υπολογιστή (5), όπου το λογισμικό του Zetasizer αναπαράγει το φάσμα συχνοτήτων από το οποίο μετρίεται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα και κατ' επέκταση το δυναμικό Z.

Η ένταση του σκεδασμένου φωτός εντός του κελιού της μέτρησης, πρέπει να είναι εντός ενός συγκεκριμένου εύρους, έτσι ώστε να μετρηθεί με επιτυχία από τον ανιχνευτή. Εάν ανιχνευθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα ακτινοβολίας, τότε ο ανιχνευτής παθαίνει υπερφόρτωση. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, χρησιμοποιείται ένας εξασθενητής (6) για να μειωθεί η ένταση του laser και συνεπώς και η ένταση της σκέδασης. Με άλλα λόγια, σε δείγματα στα οποία δεν παρατηρείται μεγάλη σκέδαση φωτός (π.χ. πολύ μικρά σωματίδια ή δείγματα πολύ χαμηλής συγκέντρωσης) πρέπει η ποσότητα του σκεδασμένου φωτός να αυξηθεί. Ο εξασθενητής τότε αυτόματα θα επιτρέψει περισσότερο φως να διαπεράσει το δείγμα. Αντίστοιχα θα μειώσει την ποσότητα του φωτός που θα διαπεράσει ένα δείγμα, εάν πρόκειται για πυκνότερο δείγμα με μεγαλύτερα σωματίδια, το οποίο προκαλεί μεγαλύτερη σκέδαση φωτός.

Για τη διόρθωση οποιωνδήποτε διαφορών στο πάχος τοιχώματος του κελιού και της διάθλασης του διαλύτη, έχει εγκατασταθεί αντισταθμιστικός οπτικός εξοπλισμός (7) εντός του χώρου στον οποίο γίνεται η σκέδαση της ακτίνας έτσι ώστε να διατηρηθεί η ευθυγράμμιση των ακτίνων. Η διάταξη φαίνεται παρακάτω :



Σχήμα 6. Διάταξη συσκευής μέτρησης.

7.4 Φασματόμετρο UV-Vis (BOECO MODEL S-20)

Το φασματόμετρο MODEL S-20 είναι ένας μικροεπεξεργαστής που ελέγχει το φασματόμετρο ορατού φάσματος το οποίο καλύπτει μήκη κύματος από 320 έως 1000 nm με εύρος ζώνης 8 nm. Ο μονοχρωμάτορας είναι ένας τροποποιημένος Czerny Turner, που έχει ενσωματωμένο βήμα 1200 γραμμές/ mm ολογραφικής περίθλασης.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ακόλουθη λειτουργία. Το φως που παράγεται από ένα λαμπτήρα κατευθύνεται με μία ορισμένη ισχύ (P_0) προς ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει μία ουσία σε ορισμένη συγκέντρωση (C_g/l). Το υδατικό διάλυμα απορροφάει τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και έτσι η ακτινοβολία που απομακρύνεται από αυτό έχει ισχύ P μικρότερη από την αρχική P_0 ($P < P_0$). Η απορρόφηση A της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης (C) της ουσίας μέσα στο υδατικό διάλυμα. Όσο πυκνότερο είναι το διάλυμα τόσο περισσότερη ακτινοβολία απορροφάται δηλαδή τόσο το P είναι μικρότερο.

Το φασματόμετρο διαθέτει τρεις λειτουργίες:

- Μέτρηση συντελεστή διαπερατότητας
- Μέτρηση απορρόφησης
- Μέτρηση συγκέντρωσης



Εικόνα 14. Φασματοόμετρο Boeco Model S-20. Πηγή:
(www.rainbowsarl.com/img/pdf/boeco/spectrophotometer.pdf)

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία μέτρησης της απορρόφησης. Το μήκος κύματος ορίζεται στα 750 nm. Κατά τη μέτρηση, ποσότητα απιονισμένου νερού εισάγεται σε κυψελίδα και στην συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή. Αφού γίνει βαθμονόμηση της συσκευής, εισάγεται εκ νέου στην κυψελίδα ποσότητα καλλιέργειας μικροαλγών αραιωμένη με απιονισμένο νερό στην επιθυμητή αναλογία. Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει υπολογίζεται η συγκέντρωση της καλλιέργειας σε mg/L.

8 Πειραματική διαδικασία

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες που έλαβαν χώρα. Οι διαδικασίες αφορούν την παραγωγή της βιομάζας, τη σύνθεση μαγνητικών σωματιδίων, τις μετρήσεις δυναμικού zeta και τη συγκομιδή της βιομάζας. Στη συνέχεια, περιγράφεται η μέθοδος διάρρηξης των κυττάρων με υπερκρίσιμο CO₂, η εκχύλιση με τη μέθοδο Folch και η εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂.

8.1 Μικροοργανισμός

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μικροάλγος *Nannochloropsis oceanica* CCMP 1779 (The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton). Η διατήρηση του μικροάλγους πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο που αναφέρεται στην επόμενη παράγραφο στους 20°C με την ανανέωση να γίνεται κάθε τρεις με τέσσερις εβδομάδες. Σύμφωνα με τη διαδικασία που προτείνεται από την UTEX (The culture collection of Algae at University of Texas Austin), το στέλεχος διατηρείται για τρεις γενεές στο θρεπτικό μέσο σε κωνικές φιάλες κλεισμένες με αποστειρωμένο βαμβάκι, με φωτισμό (λάμπες φθορισμού) που ρυθμίστηκε στα 75 μmol.m⁻².s⁻¹, 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι. Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους οφείλεται στις πολλαπλές βιομηχανικές χρήσεις λόγω του υψηλού λιπιδικού περιεχομένου του. Επιπλέον, έχει υψηλές συγκεντρώσεις σε καροτενοειδή και χρωστικές οσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών.

8.1.1 Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica*

Το μικροάλγος *Nannochloropsis oceanica* αναπτύσσεται σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με f/2 θρεπτικά συστατικά. Το διάλυμα ιχνοστοιχείων περιέχει (ανά λίτρο) 75 g NaNO₃, 5 g NaH₂PO₄·H₂O, 4.36 g Na₂·EDTA, 3.16 g FeCl₃·6H₂O, 180 mg MnCl₂·4H₂O, 10 mg CoCl₂·6H₂O, 10 mg CuSO₄·5H₂O, 23 mg ZnSO₄·7H₂O, 6 mg Na₂MoO₄, 100 mg vitamin B1, 0.5 mg vitamin B12 και 0.5 mg biotin. Το pH της καλλιέργειας ρυθμίστηκε στην τιμή 8.0 με προσθήκη ρυθμιστικού TRIS (hydroxymethyl)-aminomethane HCl σε συγκέντρωση 7.88 g/L.

8.1.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η ανάπτυξη του μικροάλγους πραγματοποιείται ως εξής:

- a) *Προκαλλιέργεια*: 10% (v/v) από το υλικό διατήρησης του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό φιαλών Erlenmeyer όγκου 250 mL οι

οποίες περιέχουν 100 mL από το θρεπτικό μέσο (§ 8.1.1). Η επώαση του μικροοργανισμού πραγματοποιείται στους 20°C για 5 ημέρες. Ο φωτισμός ρυθμίζεται στα $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι.

- b) *Καλλιέργεια*: Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Erlenmeyer όγκου 3000 mL, με τον τρόπο που περιγράφεται για την προκαλλιέργεια και εμβολιάστηκε με το 10% (v/v) αυτής. Η επώαση πραγματοποιείται στους 20°C για 12-14 ημέρες σε περιστρεφόμενο επωαστήρα (130 rpm).

Δείγματα λαμβάνονται κάθε μέρα και αναλύονται ως προς την κυτταρική ανάπτυξη και τη χλωροφύλλη.

8.2 Παρασκευή μαγνητικών σωματιδίων

Η διαδικασία παρασκευής μαγνητικών σωματιδίων είναι μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία και περιλαμβάνει τη χρήση μικρού αριθμού αντιδραστηρίων για την παρασκευή των σωματιδίων [41]. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έχει ως εξής:

Ποσότητα 1 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99+%) προστίθεται σε 100 mL απιονισμένου νερού και το διάλυμα τίθεται υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Έπειτα διάλυμα NaOH 1 M προστίθεται στάγδην στο αρχικό διάλυμα μέχρι το pH του να φτάσει 11-12. Όταν το pH φτάσει μεταξύ των επιθυμητών τιμών, προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 200 mL και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 700 W για 10 λεπτά. Κατά τη θέρμανση του διαλύματος παρατηρείται σχηματισμός μαύρου ιζήματος. Με το πέρας της θέρμανσης, ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και έκπλυση του ιζήματος αρκετές φορές με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα. Κατά τη διαδικασία της έκπλυσης γίνεται χρήση μαγνήτη (NdFeB, N40) με σκοπό τον διαχωρισμό του υπερκείμενου διαλύματος από τα σωματίδια. Στη συνέχεια, τα σωματίδια διατηρούνται σε απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα μαγνητικά σωματίδια του Fe_3O_4 που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία μπορούν να θεωρηθούν και ως γυμνά, μη επικαλυμμένα μαγνητικά σωματίδια [41]. Η διαδικασία παρασκευής που περιγράφηκε, βασίζεται στη μικρής χρονικής διάρκειας επεξεργασία του $\text{Fe}(\text{OH})_2$ σε μικροκύματα. Το υδροξείδιο του σιδήρου σχηματίζεται από ένα φθινό πρόδρομο ιόν, τον ένυδρο θειικό σίδηρο (II) ($\text{Fe}_3\text{SO}_4\cdot 7\cdot\text{H}_2\text{O}$), κατά την επεξεργασία του σε βασικό περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή συγκριτικά με άλλες μεθόδους υδροθερμικής επεξεργασίας, οι οποίες χρησιμοποιούν και $\text{Fe}(\text{II})$ και $\text{Fe}(\text{III})$ ως πρόδρομα ιόντα, με αποτέλεσμα η διαδικασία να είναι πιο πολύπλοκη και η ποιότητα των μαγνητικών σωματιδίων να επηρεάζεται από τη στοιχειομετρική αναλογία των $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Επίσης, στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται κάποιο αδρανές αέριο για να περιορίσει το οξυγόνο το οποίο

αντιδρά με το σχηματιζόμενο ίζημα. Αυτό επιφέρει αύξηση του κόστους λειτουργίας αλλά και της πολυπλοκότητας του εξοπλισμού [39]. Ακόμη και σε περιπτώσεις που παραλείπεται το αδρανές αέριο, η παρασκευή γίνεται παρουσία αντιδραστηρίων που είναι ανθεκτικά στην οξείδωση [39]. Επιπλέον, ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της επεξεργασία στα μικροκύματα, είναι ότι χρειάζεται λίγα λεπτά για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ενώ οι άλλες καταγεγραμμένες μέθοδοι χρειάζονται από ώρες έως και μέρες για να συνθέσουν μια επαρκή ποσότητα μαγνητικών σωματιδίων [39].

8.3 Μετρήσεις δυναμικού Zeta και διαμέτρου σωματιδίων

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων της καλλιέργειας και των μαγνητικών σωματιδίων κατά τη μεταβολή του pH, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του μεγέθους τους και του δυναμικού Zeta με χρήση της συσκευής ZETASIZER. Η διαδικασία περιελάμβανε τη λήψη δείγματος βιομάζας και δείγματος μαγνητικών σωματιδίων, την αραίωσή (1:50) τους σε απιονισμένο νερό και υποβολή σε μηχανική ανάδευση. Στη συνέχεια, λαμβάνεται ποσότητα από κάθε δείγμα και ρυθμίζεται το pH της στην επιθυμητή τιμή, στην οποία θα γίνει η μέτρηση. Έπειτα, το δείγμα με το ρυθμισμένο pH, εισάγεται σε κυψελίδα U (DTS1070) και τοποθετείται στη συσκευή. Αφού γίνει η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου (Standard operation procedure), αρχίζει η μέτρηση του μεγέθους και του δυναμικού Zeta. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και χρησιμοποιούνται για περαιτέρω επεξεργασία. Τέλος, η κυψελίδα αφαιρείται από τη συσκευή, αποχύνεται το περιεχόμενό της και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όσες μετρήσεις θέλουμε να πραγματοποιήσουμε.

8.4 Συγκομιδή μικροαλγών

Η συγκομιδή πραγματοποιείται στην καλλιέργεια που παράγεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 8.1. Η πειραματική διαδικασία της συγκομιδής της βιομάζας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ανάδευση καλλιέργειας με στόχο την ομοιόμορφη κατανομή της βιομάζας στο μέσο καλλιέργειας.
2. Λήψη δείγματος 10 mL καλλιέργειας και καταγραφή του pH του. Επίσης λαμβάνεται μικρή ποσότητα δείγματος και οδηγείται προς φωτομέτρηση για τον προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης της βιομάζας.
3. Ξήρανση μαγνητικών σωματιδίων σε φούρνο υπό κενό στους 60°C.
4. Ρύθμιση pH δείγματος με χρήση αραιού HCl ή αραιού NaOH.
5. Υπολογισμός και ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητας μαγνητικών σωματιδίων.

6. Ανάμιξη μαγνητικών σωματιδίων με 2 mL από το δείγμα που λήφθηκε προηγουμένως, και τοποθέτηση του σε συσκευή υπερήχων για 1,5 λεπτό, ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα των μαγνητικών σωματιδίων και να έχουν καλύτερη διασπορά.
7. Προσθήκη της υπόλοιπης ποσότητας του δείγματος στο διάλυμα που τοποθετήθηκε στη συσκευή υπερήχων.
8. Το τελικό δείγμα τίθεται υπό μηχανική ανάδευση για το χρόνο που απαιτείται σε κάθε περίπτωση.
9. Ακολουθεί τοποθέτηση του δείγματος για 3 λεπτά σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο με σκοπό το διαχωρισμό των συσσωματωμάτων (κύτταρα και σωματίδια) από το υπερκείμενο υγρό.
10. Λήψη μικρής ποσότητας δείγματος υπερκείμενου υγρού με σκοπό τη φωτομέτρησή του.

Ο προσδιορισμός της απόδοσης ανάκτησης των μικροαλγών πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του κυτταρικού εναιωρήματος πριν και μετά τη συγκομιδή στα 750nm με χρήση φασματοφωτόμετρου UV/VIS (BOECO MODEL S-20 VISIBLE RANGE SPECTROPHOTOMETER). Η απόδοση της ανάκτησης (R), ορίζεται ως η αναλογία της μάζας των κυττάρων μετά τη συγκομιδή προς την αρχική μάζα των κυττάρων και υπολογίζεται ως εξής:

$$R = \left[1 - \frac{OP}{OP_0} \right] * 100\% \quad (3)$$

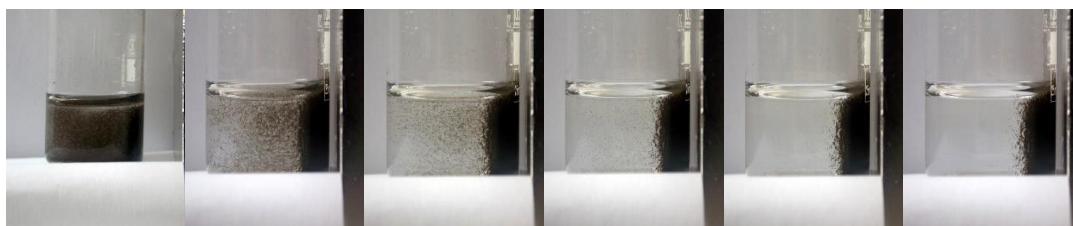
όπου OP_0 είναι η αρχική απορρόφηση του εναιωρήματος των μικροαλγών πριν το διαχωρισμό και OP είναι η απορρόφηση του υπερκείμενου μετά τον μαγνητικό διαχωρισμό. Η απορρόφηση συνδέεται με τη συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας των μικροαλγών μέσω της καμπύλης αναφοράς :

$$y = 226.61 \cdot x \cdot a \quad (4)$$

όπου y είναι η συγκέντρωση μικροαλγών (mg/l), x η απορρόφηση (Abs) και a είναι η αραίωση του φωτομετρούμενου δείγματος (Αραίωση=1 όγκος δείγματος + K όγκοι νερού). Η κροκίδωση των μικροαλγών θεωρείται αμελητέα σε αυτή την περίπτωση καθώς το μικρό μέγεθος του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* και η ταχύτητα της μέτρησης δεν το επιτρέπουν. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται ο μαγνητικός διαχωρισμός και το αποτέλεσμα που επιφέρει σε μια αρχική ποσότητα καλλιέργειας.



Εικόνα 15. Αρχική ποσότητα βιομάζας



Εικόνα 16. Ποσότητα καλλιέργειας και μαγνητικών σωματιδίων στη φάση του μαγνητικού διαχωρισμού (0-5 sec).

Μετά το πέρας της συγκομιδής, το μίγμα βιομάζας και σωματιδίων συλλέγεται σε κωνική φιάλη και αποθηκεύεται στο ψυγείο, μέχρι να υποστεί περεταίρω επεξεργασία.

8.5 Διάρρηξη κυττάρων με υπερκρίσιμο CO₂

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατόπιν της παραλαβής της ξηρής βιομάζας είναι η εξής: ορισμένη ποσότητα ξηρής βιομάζας οδηγείται σε θερμαινόμενο δοχείο της συσκευής SPA (SPATM, LDC Analytical Inc) η οποία τροφοδοτείται με CO₂ σε υπερκρίσιμη πίεση και θερμοκρασία.

Με κατάλληλο χειρισμό ρυθμίζεται η επιθυμητή θερμοκρασία του κελίου εκτόνωσης στους 40°C καθώς και η πίεση στην οποία θα λάβει χώρα η συμπίεση του CO₂ στα 300 bar. Η πίεση αυτή θεωρείται αρκετά υψηλή και ικανή για τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος των μικροαλγών κατά την εκτόνωση. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος καθορίστηκαν με βάση τα στοιχεία που ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία [63]. Σκοπός είναι να μελετηθεί η επίδραση της εκτόνωσης στην εκχύλιση των λιπαρών οξέων της βιομάζας για έναν κύκλο εκτόνωσης και έπειτα για τρεις. Και στις δυο περιπτώσεις ο χρόνος εφαρμογής υψηλής πίεσης στο θερμοστατούμενο δοχείο που περιέχει τη βιομάζα ορίστηκε στα 20 min. Ο χρόνος εκτόνωσης του CO₂ κυμαινόταν μεταξύ 2-3 min. Στη συνέχεια τα δείγματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με υπερκρίσιμο CO₂ οδηγούνται προς

εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Η εκχύλιση διεξάγεται με τη μέθοδο Folch και περιγράφεται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο. Για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης, ποσότητα ξηρής βιομάζας ανάλογη με αυτές που έχουν υποστεί επεξεργασία με υπερκρίσιμο CO₂, εκχυλίστηκε με την ίδια μέθοδο χωρίς να έχει υποστεί εκτόνωση. Η σύγκριση πραγματοποιείται για χρονικό διάστημα εκχύλισης 2 ωρών (1ος κύκλος) και 72 ωρών (2ος κύκλος). Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι οι 72 ώρες αναφέρονται στην εκχύλιση των κυτταρικών συστατικών που δεν έχουν εκχυλιστεί στον 1ο κύκλο.

8.6 Μέθοδος Folch

Για την εκχύλιση των λιπαρών οξέων του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica* έγινε χρήση της μεθόδου Folch [66] καθώς αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης, όσον αφορά την απόδοση ανάκτησης των λιπαρών οξέων από μικροάλγη. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση ενός πολικού διαλύτη (μεθανόλη, MeOH) και ενός μη πολικού διαλύτη (χλωροφόρμιο, CHCl₃) σε αναλογία (1:2).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής: Σε ορισμένη ποσότητα ξηρής βιομάζας προστέθηκε η προβλεπόμενη, με βάση τη μέθοδο Folch ποσότητα διαλυτών και ακολούθησε έντονη ανάδευση του μίγματος με χρήση συσκευής Vortex για 10 λεπτά. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τον απαιτούμενο χρόνο κάθε φορά. Μετά το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε φυγοκέντρηση της βιομάζας, προκειμένου να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός μεταξύ της φάσεως των διαλυτών πλούσια σε λιπαρά οξέα και των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών σε θερμαινόμενο περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, μετά την απομάκρυνση των διαλυτών, τα λιπίδια προσδιορίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και εκφράστηκαν σε g λιπιδίων ανά g βιομάζας.

8.7 Υπερκρίσιμη εκχύλιση

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή SEPAREX SFE 500. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της συγκομιδής που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει άμεσος τρόπος εύρεσης της απόδοσης της μεθόδου της υπερκρίσιμης εκχύλισης. Η πολύ μικρή ποσότητα δείγματος η οποία θα υποστεί υπερκρίσιμη εκχύλιση, καθιστά αδύνατη τη συλλογή του εκχυλίσματος. Ένα άλλο πρόβλημα στη συλλογή του εκχυλίσματος δημιουργείται λόγω του μεγάλου μήκους των σωληνώσεων της συσκευής με αποτέλεσμα ορισμένη ποσότητα να μην μπορεί να ληφθεί στην έξοδο. Ακόμη, επειδή το CO₂ μπορεί να συμπαρασύρει και άλλα ενδοκυτταρικά προϊόντα

κατά τη ροή του εντός της συσκευής, το εκχύλισμα μπορεί να περιέχει και άλλες ουσίες. Για όλους τους παραπάνω λόγους, η εύρεση της απόδοσης της μεθόδου βασίζεται στην ανάλυση του υπολείμματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το υπόλειμμα υφίσταται εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες με σκοπό την εύρεση της ποσότητας που δεν έχει εκχυλιστεί.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής: Ορισμένη ποσότητα βιομάζας, που συλλέχθηκε με μαγνητικά σωματίδια, ξηραίνεται υπό κενό στους 40 °C μέχρι σταθεροποίησης της μάζας της.

Το δείγμα εισάγεται σε προζυγισμένο φάκελο από διηθητικό χαρτί και τοποθετείται στο δοχείο εκχύλισης. Έπειτα, με κατάλληλη ρύθμιση αρχίζει η εισαγωγή CO₂ στο σύστημα. Το δοχείο αρχικά φτάνει στην πίεση της φιάλης CO₂, ενώ στη συνέχεια η πίεση αυξάνεται με τη βοήθεια αντλίας. Το δοχείο θερμαίνεται στους 40 °C. Όταν η πίεση φτάσει στα 250 bar, το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει για 20 λεπτά και μετά εκτονώνεται μέχρι την ατμοσφαιρική πίεση. Ο χρόνος εκτόνωσης κυμαίνεται από 2 έως 3 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές.

Με το πέρα της τρίτης εκτόνωσης, αυξάνεται πάλι η πίεση στο δοχείο έως τα 250 bar και ρυθμίζεται το σύστημα ώστε να διατηρείται η επιθυμητή ροή CO₂. Μετά από 20 λεπτά το δοχείο εκτονώνεται μέχρι ατμοσφαιρικής πίεσης. Ο χρόνος εκτόνωσης είναι περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, ο φάκελος που περιέχει τη βιομάζα ζυγίζεται, και εισάγεται ξανά στο δοχείο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί η μάζα του φακέλου.

Μετά τη σταθεροποίηση της μάζας του φακέλου, λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα από το περιεχόμενό του, και οδηγείται προς εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Για λόγους σύγκρισης, ίδια ποσότητα βιομάζας με αυτήν που λήφθηκε για ανάλυση από την υπερκρίσιμη εκχύλιση, χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες.

Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών, τα λιπίδια προσδιορίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και εκφράστηκαν σε g λιπιδίων ανά g βιομάζας. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν υπολογίζεται η απόδοση της υπερκρίσιμης εκχύλισης σύμφωνα με τον τύπο:

$$A \% = 100\% * (Li - L_{sfe}) / Li \quad (5)$$

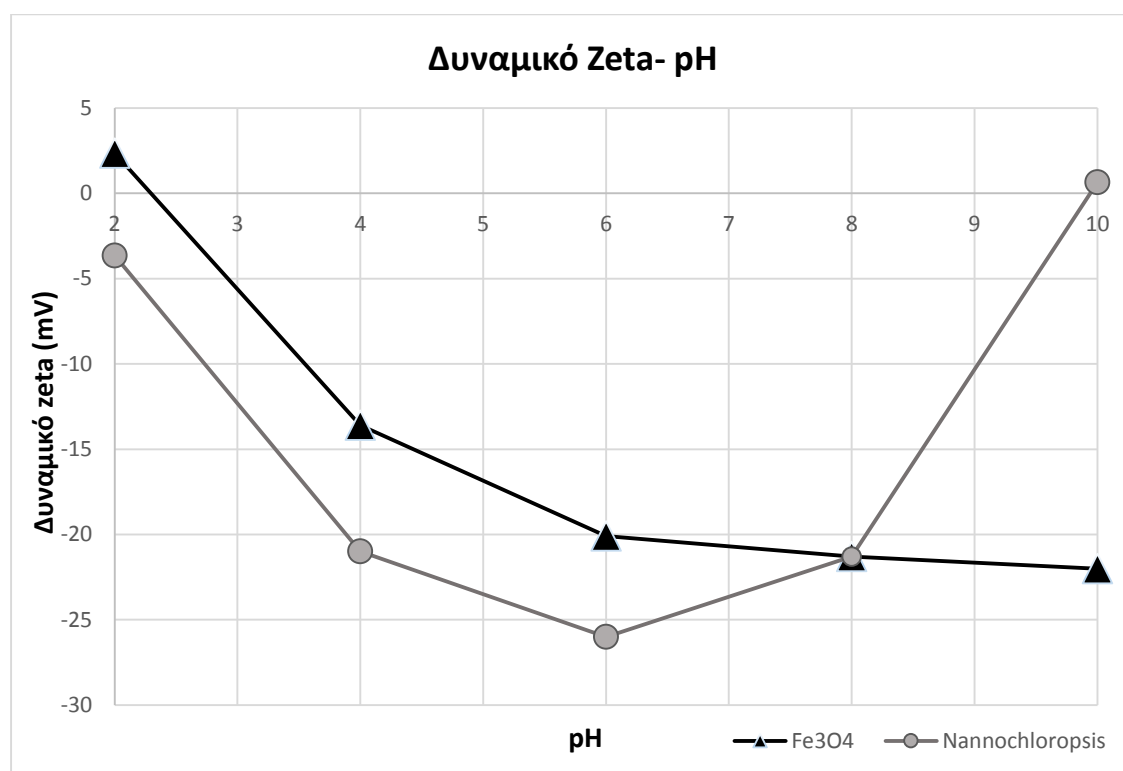
Όπου: L_i = ποσοστό λιπιδίων πρώτου δείγματος,

L_{sfe} = ποσοστό λιπιδίων σε δείγμα που υπέστη υπερκρίσιμη εκχύλιση

9 Αποτελέσματα- σχολιασμός

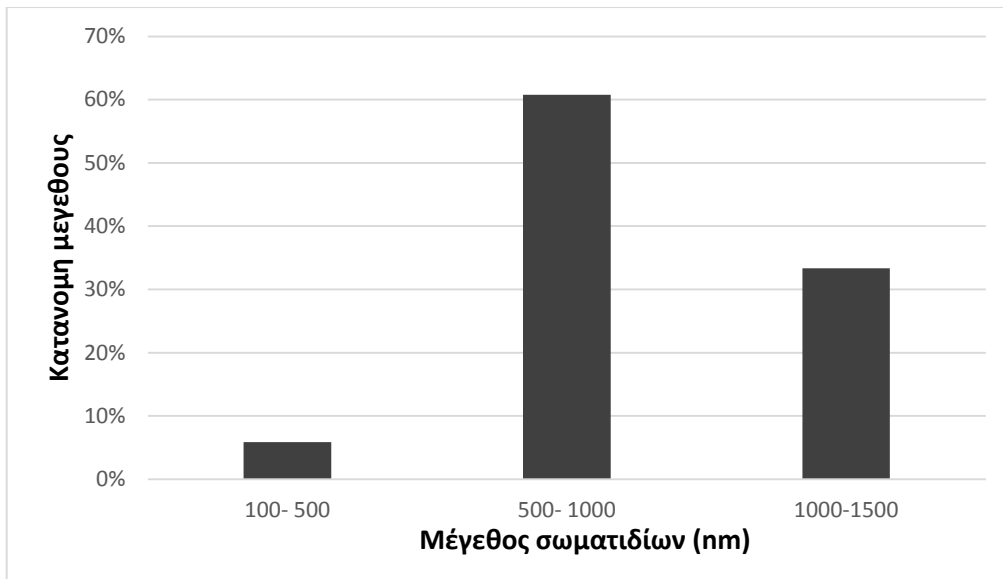
9.1 Μετρήσεις δυναμικού zeta και διαμέτρου κυττάρων και μαγνητικών σωματιδίων

Για να κατανοηθεί η επίδραση της μεταβολής του pH στα μαγνητικά σωματίδια και στα κύτταρα της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικού ζήτα με χρήση της συσκευής Zetasizer Nano ZS 173. Οι μετρήσεις έγιναν σε ένα εύρος τιμών pH από 2 έως 10, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην §7.3. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν:



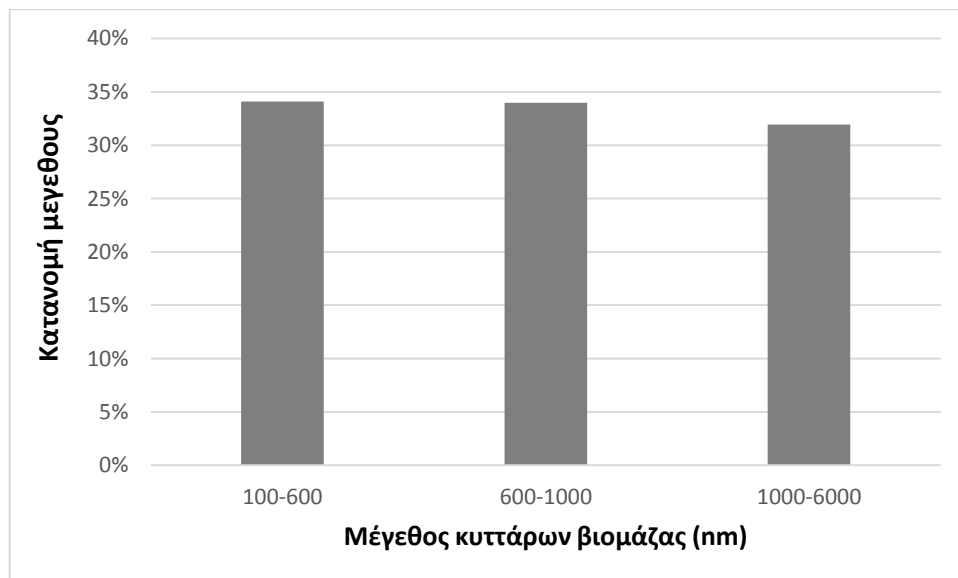
Διάγραμμα 9. Συμπεριφορά zeta δυναμικού μαγνητικών σωματιδίων και *Nannochloropsis oceanica*, κατά τη μεταβολή του pH.

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, τα μαγνητικά σωματίδια ξεκινούν από θετικές τιμές ηλεκτραρνητικότητας σε pH=2. Όσο αυξάνεται το pH, οι τιμές γίνονται αρνητικές και λαμβάνουν τη χαμηλότερη τιμή τους σε pH=10. Από την άλλη, η συμπεριφορά των κυττάρων της καλλιέργειας είναι πιο πολύπλοκη. Ξεκινούν από αρνητικές τιμές ηλεκτραρνητικότητας σε pH=2, συνεχίζουν να μειώνονται και φτάνουν στη ελάχιστη τιμή σε pH=6. Στη συνέχεια, η ηλεκτραρνητικότητα αυξάνεται σταδιακά και γίνεται θετική σε pH=10. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζεται στο pH=8, όπου τα μαγνητικά σωματίδια και τα κύτταρα έχουν την ίδια ηλεκτραρνητικότητα.



Διάγραμμα 10. Κατανομή μεγέθους μαγνητικών σωματιδίων.

Το μέγεθος των μαγνητικών σωματιδίων εμφανίζει μία ανομοιόμορφη κατανομή. Για το μεγαλύτερο ποσοστό, το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 500- 1000 νανομέτρων, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό έχει μέγεθος μικρότερο από 500 nm. Αυτός είναι και ο λόγος που τα μαγνητικά σωματίδια που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο που αναφέρεται στην §8.2, θεωρείται πως ανήκουν στην κατηγορία των νανοσωματιδίων. Τα υπόλοιπα σωματίδια είναι μεγαλύτερα από 1000 nm. Η ύπαρξη σωματιδίων με τέτοιο μέγεθος δικαιολογείται από το φαινόμενο συσσωμάτωσης που παρατηρήθηκε σε πολύ όξινο pH.



Διάγραμμα 11. Κατανομή μεγέθους κυττάρων βιομάζας.

Η μέτρηση του μεγέθους των κυττάρων της βιομάζας σε αντίθεση με τα μαγνητικά σωματίδια, εμφανίζει μια πιο ομοιόμορφη κατανομή. Σχεδόν τα 2/3 των μετρηθέντων σωματιδίων έχουν μέγεθος μικρότερο από 1000 nm. Τα υπόλοιπα

κατανέμονται μεταξύ 1000 – 6000 nm. Παρατηρείται μια σημαντική διαφορά των μεγεθών που μπορεί να αποδοθεί στον τρόπο προετοιμασίας του δείγματος και στην ύπαρξη στο δείγμα και άλλων ουσιών πλην των κυττάρων. Οι ουσίες αυτές μπορεί να προέρχονται από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ή ακόμη και από ενδοκυτταρικά προϊόντα κυττάρων που αυτολύθησαν.

9.2 Συγκομιδή βιομάζας

Κατά την πειραματική διαδικασία του μαγνητικού διαχωρισμού μελετήθηκε η επίδραση στην απόδοση συγκομιδής των εξής παραμέτρων:

- pH βιομάζας
- αναλογία μάζας μαγνητικών σωματιδίων/βιομάζα (mg/mb)
- χρόνος ανάδευσης του διαλύματος βιομάζας σωματιδίων
- ταχύτητα ανάδευσης του διαλύματος βιομάζας σωματιδίων
- χρόνος έκθεση στο μαγνητικό πεδίο

Η επίδραση των τεσσάρων πρώτων παραμέτρων εξετάζεται στην επόμενη ενότητα, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην §8.4.

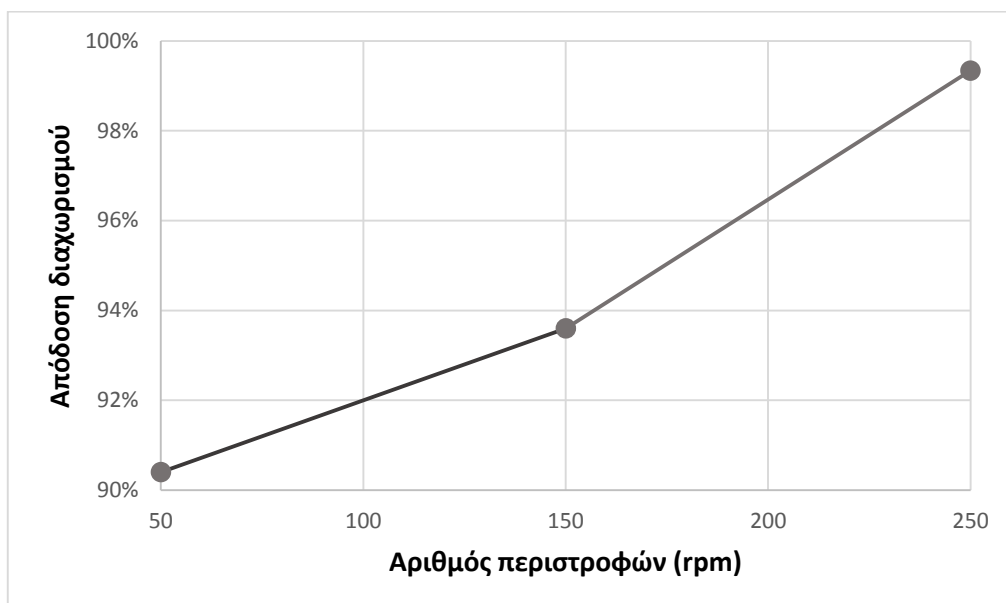
Όσο αναφορά το χρόνο επαφής, δε μελετήθηκε η επίδραση στην απόδοση της συγκομιδής, διότι ο διαχωρισμός γίνεται ήδη από τα πρώτα δευτερόλεπτα. Ωστόσο, η μαγνήτιση κρατάει 3 λεπτά, χρόνο επαρκή για τον διαχωρισμό ακόμη και στην περίπτωση μικρών αποδόσεων, και όχι αρκετά μεγάλο ώστε στο διάστημα αυτό να επέλθει κροκίδωση και καθίζηση των κυττάρων που δεν συνδέθηκαν με τα σωματίδια, γεγονός που θα επηρέαζε την τελική μέτρηση.

9.2.1 Προκαταρκτικός πειραματικός σχεδιασμός

Η απόδοση του μαγνητικού διαχωρισμού, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του μικροάλλου [30,39,41]. Για τον λόγο αυτό, θεωρήθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί μια προκαταρκτική σειρά πειραματικών μετρήσεων, για να μελετηθεί η συμπεριφορά του μικροάλλου *Nannochloropsis oceanica* στις μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Πιο αναλυτικά, εξετάστηκε η επίδραση της μεταβολής του αριθμού στροφών, του χρόνου ανάδευσης, του pH και της αναλογίας μαζών μαγνητικών σωματιδίων- βιομάζας. Η αναλογία μαζών ορίζεται ως m_R . Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών.

9.2.1.1 Επίδραση αριθμού στροφών

Στην παρούσα υποενότητα, παρουσιάζεται η επίδραση του αριθμού στροφών στην απόδοση του μαγνητικού διαχωρισμού, όπως αυτή σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε. Για σταθερές τιμές των παραμέτρων pH, χρόνος ανάδευσης και αναλογία μαζών, εξετάστηκαν οι αποδόσεις σε 3 διαφορετικές τιμές αριθμού περιστροφών. Έτσι, για pH=10, t=10min, και m_n/m_b =10, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μετρήσεις σε 50rpm, 150 rpm και 250 rpm, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

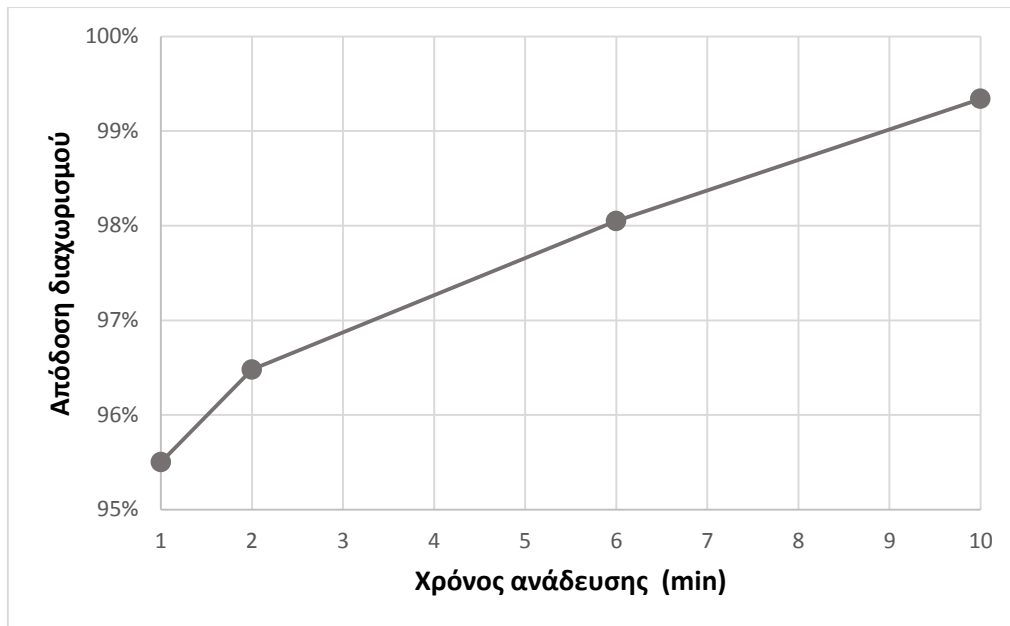


Διάγραμμα 12. Επίδραση ρυθμού ανάδευσης στην απόδοση διαχωρισμού για pH=10, χρόνος ανάδευσης 10 min και m_R=10.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, ο ρυθμός ανάδευσης έχει θετική επίδραση στο διαχωρισμό. Στις 50 rpm, η απόδοση είναι λίγο μεγαλύτερη του 90%. Με την αύξηση των στροφών στις 150, η απόδοση φτάνει στο 94%, ενώ για 250 rpm είναι μεγαλύτερη από 99%. Με λίγα λόγια, αποδεικνύεται ότι η εντονότερη μηχανική ανάδευση βελτιώνει το διαχωρισμό βιομάζας σωματιδίων από το υδατικό μέσο που περιέχονται.

9.2.1.2 Επίδραση χρόνου ανάδευσης

Στην υποενότητα αυτή εξετάζεται η επίδραση του χρόνου ανάδευσης στην απόδοση του μαγνητικού διαχωρισμού, θεωρώντας ως σταθερές λειτουργικές παραμέτρους την τιμή του pH, το ρυθμό ανάδευσης και την αναλογία μαζών των μαγνητικών σωματιδίων προς αυτή των κυττάρων της καλλιέργειας. Στο διάγραμμα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

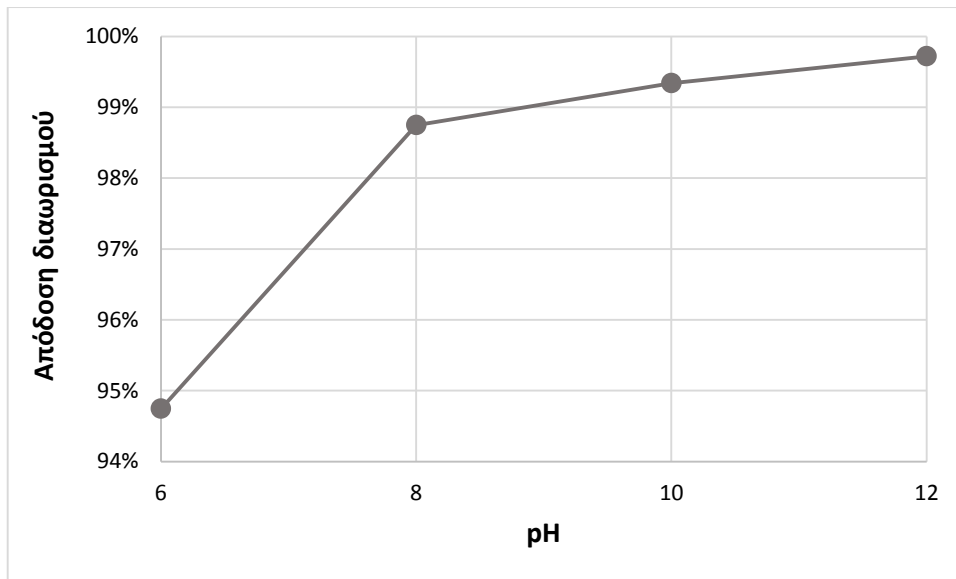


Διάγραμμα 13. Επίδραση χρόνου ανάδευσης στην απόδοση διαχωρισμού για σταθερές τιμές $pH=10$, αριθμό περιστροφών 250 rpm και $m_R=10$.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα η αύξηση του χρόνου ανάδευσης ευνοεί την απόδοση του διαχωρισμού. Ξεκινώντας από 1 λεπτό ανάδευσης μέχρι τα 10 λεπτά, η απόδοση αυξάνεται σταδιακά μέχρι να φτάσει στη μέγιστη τιμή της που είναι πάνω από 99%.

9.2.1.3 Επίδραση pH στην απόδοση του διαχωρισμού

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματικών μετρήσεων έδειξαν πως η μέγιστη απόδοση επιτυγχάνεται για αριθμό στροφών ίσο με 250 και χρόνο ανάδευσης ίσο με 10 λεπτά. Για τον λόγο αυτό η επόμενη σειρά πειραματικών μετρήσεων που εξετάζει την επίδραση της τιμής του pH, είχε ως σταθερές τιμές τις τιμές αυτών των παραμέτρων. Η αναλογία σωματιδίων προς τη μάζα των κυττάρων διατηρήθηκε στο ίδιο επίπεδο με τις προηγούμενες μετρήσεις και ήταν ίση με 10. Στο **Διάγραμμα 14** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης του pH στην απόδοση της συγκομιδής.



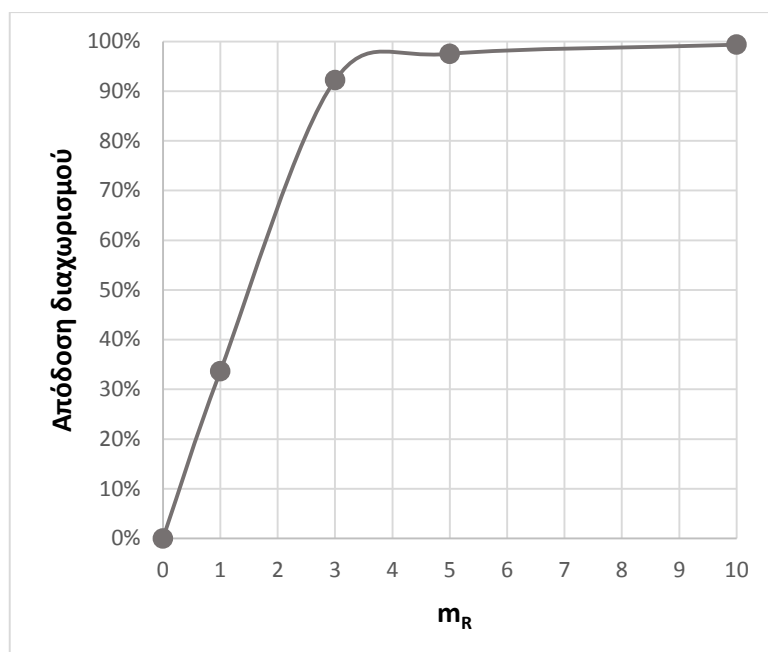
Διάγραμμα 14. Επίδραση τιμής pH στην απόδοση του διαχωρισμού για σταθερές τιμές ρυθμού περιστροφής ίσο με 250 rpm, 10 λεπτών ανάδευσης και $m_R = 10$.

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, η απόδοση αυξάνεται με την αύξηση του pH. Αρχικά, σε pH 6 η απόδοση είναι λίγο μικρότερη από 95%. Στη συνέχεια, αυξάνεται απότομα κατά τη μεταβολή του pH σε 8, για να καταλήξει σε τιμές μεγαλύτερες του 99% για pH μεγαλύτερο του 9.

9.2.1.4 Επίδραση αναλογίας μαζών σωματιδίων προς μάζα κυττάρων βιομάζας για σταθερή τιμή pH

Στην υποενότητα αυτή εξετάζεται η επίδραση της αναλογίας σωματιδίων-βιομάζας για σταθερή τιμή pH=10, σταθερό χρόνο ανάδευσης στα 10 λεπτά και τον αριθμό περιστροφών στα 250 rpm. Στο **Διάγραμμα 15** παρουσιάζονται τα σχετικά αποτελέσματα.

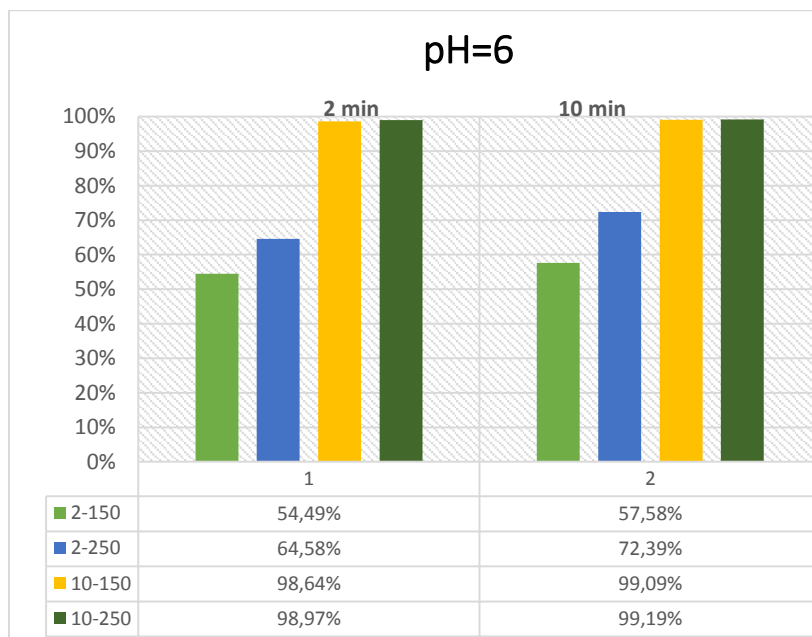
Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η απόδοση διαχωρισμού αυξάνεται όσο αυξάνεται και η αναλογία μαζών. Από αναλογία 1 έως το 3, η απόδοση εμφανίζει απότομη αύξηση, και μεταβάλλεται από 33% στα 93%. Από εκεί και μετά, η απόδοση του διαχωρισμού εμφανίζει μικρότερη αύξηση μέχρι την αναλογία 10, στην οποία ξεπερνά το 99%.



Διάγραμμα 15. Επίδραση αναλογίας μαζών στην απόδοση του διαχωρισμού για $pH=10$, 250 rpm και 10 min ανάδευσης.

9.2.1.5 Επίδραση χρόνου ανάδευσης, αριθμού στροφών, αναλογίας μαζών για σταθερές τιμές pH

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματικών μετρήσεων, σχεδιάστηκε μια νέα σειρά μετρήσεων για την εξέταση της μεταβολής της απόδοσης σε χαμηλότερο αριθμό στροφών και για μικρότερο χρόνο ανάδευσης.

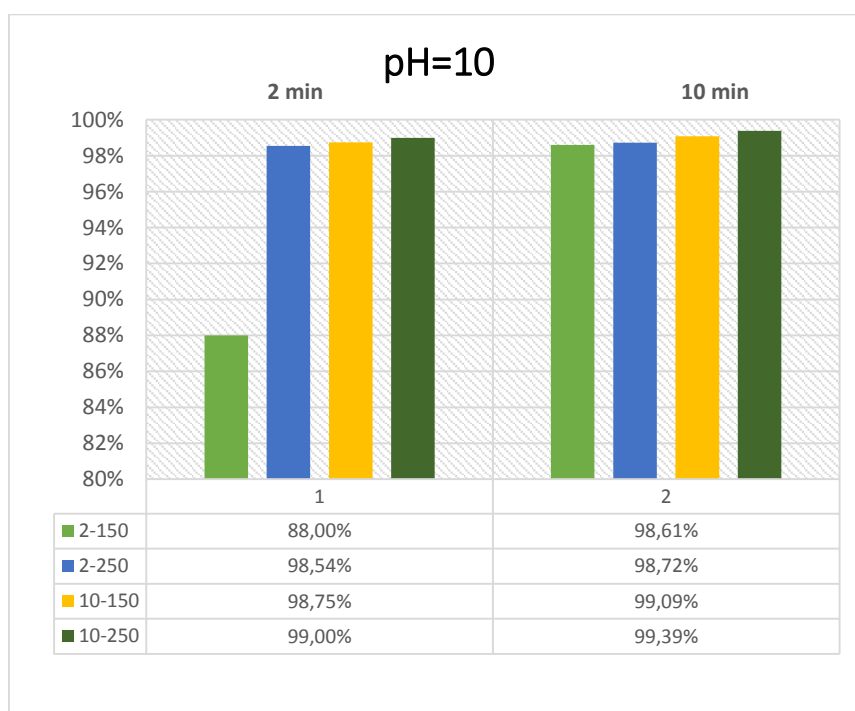


Διάγραμμα 16. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών, του αριθμού στροφών και του χρόνου ανάδευσης για $pH=6$.

Για pH=6 εξετάστηκε η επίδραση και των τριών παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση. Για αναλογία μαζών 2 και 10, αριθμό στροφών 150- 250 και χρόνο ανάδευσης 2 και 10 min, εμφανίζονται τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, για τον ίδιο χρόνο ανάδευσης, η απόδοση του διαχωρισμού αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο αριθμός των στροφών και η αναλογία μαζών. Επίσης, για την ίδια αναλογία μαζών και αριθμό στροφών, η απόδοση αυξάνει με την αύξηση του χρόνου ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα, για αναλογία 2 και αριθμό στροφών 150 και 250 rpm η απόδοση έχει πολύ χαμηλή τιμή, τόσο για 2 όσο και για 10 λεπτά ανάδευσης. Για αναλογία μαζών 10, ο αριθμός στροφών και ο χρόνος ανάδευσης φαίνεται να μην επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση καθώς ξεπερνάει το 98,50%.

Για pH=10, εξετάστηκαν οι ίδιες παράμετροι με εκείνες για pH=6. Τα αποτελέσματά τους συνοψίζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

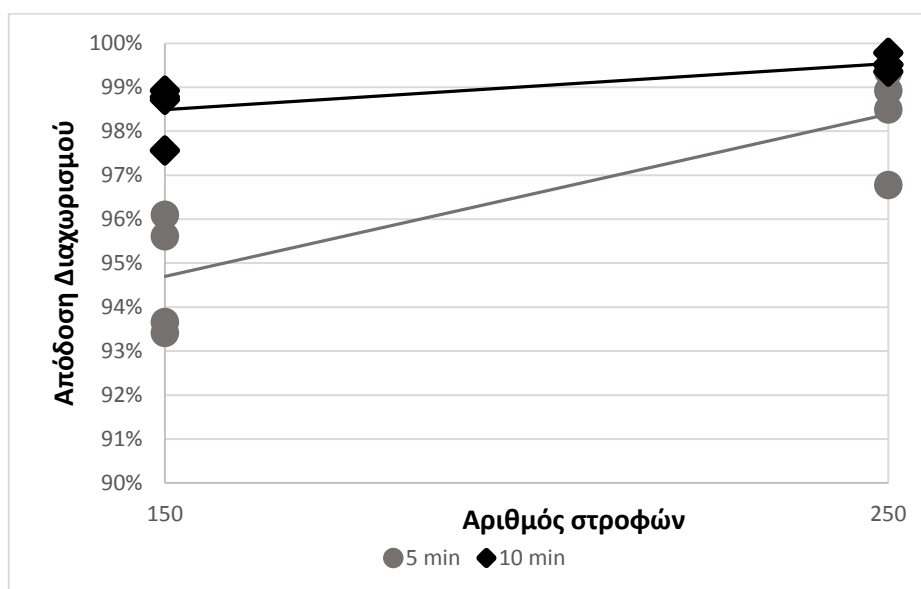


Διάγραμμα 17. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών, του αριθμού στροφών και του χρόνου ανάδευσης για pH=10.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η απόδοση αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός στροφών, ο χρόνος ανάδευσης και η αναλογία μαζών. Βέβαια, με εξαίρεση το πρώτο σημείο 2-150 που έχει 88%, η αύξηση της απόδοσης για τα υπόλοιπα σημεία είναι μικρότερη από 1%. Πιο συγκεκριμένα, για αριθμό στροφών 250 rpm και αναλογία 2 η απόδοση δείχνει να μην επηρεάζεται τόσο από το χρόνο ανάδευσης. Επίσης, για αναλογία 10, ούτε ο χρόνος ανάδευσης, αλλά ούτε και ο αριθμός στροφών επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση καθώς έχει ήδη φτάσει σε πολύ υψηλή τιμή.

9.2.1.6 Επίδραση χρόνου ανάδευσης και αριθμού στροφών για σταθερό pH και αναλογία μαζών

Η καλλιέργεια του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica* που χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές μετρήσεις, έχει pH κοντά στο 8,6. Για να περιοριστεί η χρήση ανόργανων χημικών ουσιών για τη ρύθμιση του pH, θεωρήθηκε ορθό να μελετηθεί η συγκομιδή της βιομάζας σε pH=8 που βρίσκεται πιο κοντά στο pH της καλλιέργειας. Η αναλογία μαζών επιλέχθηκε να είναι ίση με 7, καθώς προηγήθηκαν μετρήσεις για m_R 10 στο συγκεκριμένο pH. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια νέα σειρά πειραμάτων, με μεταβλητές παραμέτρους το χρόνο ανάδευσης και των αριθμό στροφών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 18. Απόδοση μαγνητικού διαχωρισμού συναρτήσει αριθμού στροφών για χρόνους ανάδευσης 5 και 10 λεπτών, pH=8 και αναλογία μαζών 7.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, όσο αυξάνεται ο χρόνος ανάδευσης και ο αριθμός των στροφών, η απόδοση διαχωρισμού μεγιστοποιείται. Για 150 rpm, παρατηρείται μια απόκλιση μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων. Για 250 rpm, οι μετρήσεις είναι πιο κοντά μεταξύ τους. Με εξαίρεση τις μετρήσεις των 5min στα 150 rpm, όλες οι υπόλοιπες εμφανίζουν απόδοση μεγαλύτερη του 97%.

Στις 150 στροφές εμφανίζονται αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων, τόσο για τα 5 λεπτά ανάδευσης όσο και για τα 10. Οι αποκλίσεις αυτές μπορεί να οφείλονται στην μη επαρκή ανάδευση τους διαλύματος. Ο συγκεκριμένος ρυθμός ανάδευσης ίσως δεν είναι αρκετός ώστε να επιφέρει την μέγιστη διασπορά των σωματιδίων κάθε φορά, οδηγώντας έτσι σε διαφορές μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων. Από την άλλη, τα πειραματικά σημεία για 250 στροφές, είναι εμφανώς καλύτερα από εκείνα για 150 στροφές. Το αποτέλεσμα

είναι λογικό, καθώς όσο αυξάνεται ο ρυθμός και ο χρόνος ανάδευσης, βελτιώνεται η απόδοση του διαχωρισμού.

9.2.1.7 Σχολιασμός προκαταρκτικής μελέτης

Από τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειραματικού σχεδιασμού προκύπτει ότι η αύξηση του αριθμού περιστροφών αυξάνει την απόδοση του διαχωρισμού. Ο λόγος που παρατηρείται αυτή η συμπεριφορά, οφείλεται στη διασπορά των σωματιδίων και των κυττάρων της βιομάζας στο υδατικό μέσο που πραγματοποιείται η συγκομιδή. Η αύξηση των περιστροφών επιφέρει αύξηση της διασποράς των μαγνητικών σωματιδίων και των κυττάρων, με αποτέλεσμα την αύξηση της δυνατότητας προσρόφησης των σωματιδίων αυτών στα κύτταρα της βιομάζας. Η απόδοση του διαχωρισμού στις 250 στροφές ανά λεπτό εμφανίζει απόδοση μεγαλύτερη του 99%. Για τον λόγο αυτό περαιτέρω μελέτη του ρυθμού ανάδευσης σε υψηλότερες τιμές δεν κρίθηκε απαραίτητη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έντονη ανάδευση σε υψηλές στροφές επιδρά αρνητικά στο διαχωρισμό, καθώς προκαλεί την αποσύνδεση των μαγνητικών σωματιδίων από τα κύτταρα της βιομάζας [41].

Όσο αναφορά την επίδραση του χρόνου ανάδευσης, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι παρόμοια με εκείνη του αριθμού περιστροφών. Πιο συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται ο χρόνος ανάδευσης τόσο πιο ομαλή γίνεται η διασπορά των σωματιδίων στο διάλυμα της βιομάζας. Αυτό επιφέρει αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων σωματιδίων που είναι ικανά συνδεθούν με τα κύτταρα της καλλιέργειας, οδηγώντας έτσι σε καλύτερο διαχωρισμό. Όπως προέκυψε από τις μετρήσεις, ο χρόνος ανάδευσης των 10 λεπτών είναι αρκετός ώστε να δώσει τη μεγαλύτερη απόδοση, και για το λόγο αυτό δεν εξετάστηκαν χρόνοι ανάδευσης μεγαλύτεροι των 10 λεπτών.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως ο καλύτερος συνδυασμός στροφών και χρόνου ανάδευσης για την επίτευξη αποδόσεων της τάξης του 99%, είναι 250 rpm και 10 λεπτά. Βέβαια, η επιλογή των παραμέτρων αυτών έγκειται στις ανάγκες του πειραματιστή και στις προδιαγραφές που έχουν τεθεί.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης του pH, διαπιστώθηκε πως η απόδοση του διαχωρισμού αυξάνεται σε βασικό περιβάλλον. Για τη συμπεριφορά της απόδοσης δύο είναι οι πιθανοί παράγοντες που την επηρεάζουν:

- η διαφορά ηλεκτρικότητας
- η υδραυλική ακτίνα των σωματιδίων και των κυττάρων σε κάθε τιμή pH

Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 14**, η διαφορά στην απόδοση μεταξύ χαμηλότερου και υψηλότερου pH είναι περίπου 5%. Αυτή η μικρή διαφορά ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε η αναλογία $m_R=10$. Για

τιμές pH μεγαλύτερες του 10, η ανάκτηση είναι μεγαλύτερη από 99% και για τον λόγο αυτό δεν εξετάστηκαν περαιτέρω τιμές.

Τέλος, η αύξηση της απόδοσης εξαιτίας της μεγαλύτερης αναλογίας μαζών είναι αναμενόμενη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνεται η μάζα των σωματιδίων στο διάλυμα, τόσο αυξάνεται και ο αριθμός των σωματιδίων, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πιθανότητα πρόσδεσης τους με τα κύτταρα. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, επιβεβαιώνεται πως δεν υπάρχει νόημα να εξεταστούν αναλογίες μεγαλύτερες του 10.

Παρόλα αυτά, από τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, εντοπίστηκαν τα όρια των τιμών των παραμέτρων για τις οποίες στη συνέχεια θα γίνει συστηματική μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της συγκομιδής.

9.2.2 Επίδραση αναλογίας μαζών και pH

Στην ενότητα αυτή εξετάζεται η επίδραση της διαφορετικής αναλογίας μαζών σωματιδίων προς βιομάζα σε τέσσερις διαφορετικές τιμές pH (4, 6, 8, 10) διατηρώντας σταθερό το χρόνο ανάδευσης στα 10 λεπτά και τον αριθμό περιστροφών στα 250 rpm. Οι τιμές των παραμέτρων και η απόδοση του διαχωρισμού παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

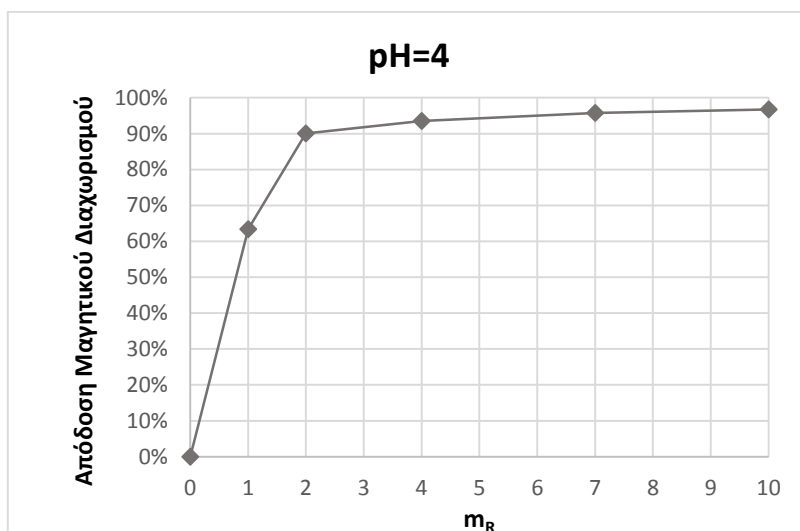
Πίνακας 6. Πειραματικές μετρήσεις για τις οποίες εξετάστηκε η μεταβολή της απόδοσης συναρτήσει της τιμής του pH και m_R .

	Αναλογία μαζών m_R						
pH	0	1	2	4	6	7	10
4	0,00%	63,41%	90,09%	93,49%	-	95,75%	96,70%
6	0,00%	58,48%	93,46%	97,07%	99,37%	99,52%	99,74%
8	0,00%	54,67%	88,94%	95,91%	99,66%	99,34%	99,84%
10	0,00%	82,74%	99,19%	99,66%	99,67%	99,65%	99,84%

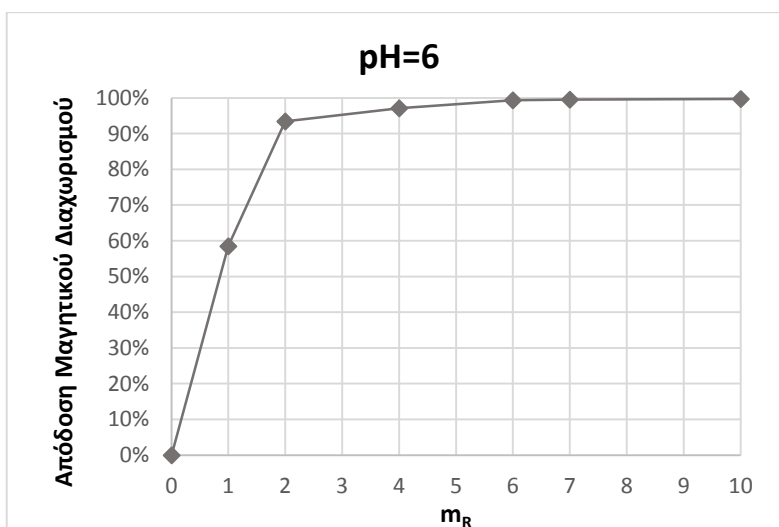
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχεδιάστηκαν δύο είδη διαγραμμάτων. Το ένα απεικονίζει για κάθε τιμή pH, την απόδοση του διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών που χρησιμοποιήθηκε, ενώ το άλλο, απεικονίζει για κάθε αναλογία μαζών, την απόδοση του διαχωρισμού συναρτήσει του pH. Οι μετρήσεις έχουν τυπική απόκλιση 0,3%.

9.2.2.1 Αναλογία μαζών για σταθερή τιμή pH

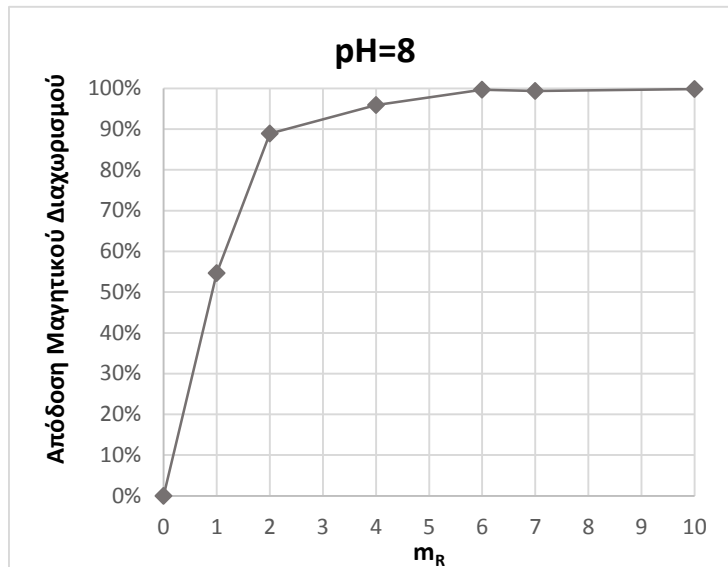
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα της απόδοσης του διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών για σταθερή τιμή pH. Για την καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων, για κάθε τιμή pH το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζεται ξεχωριστά.



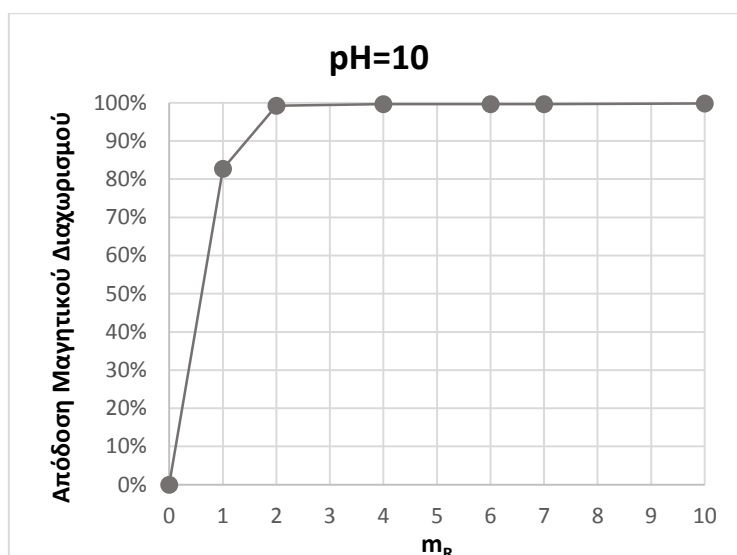
Διάγραμμα 19. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=4.



Διάγραμμα 20. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=6.



Διάγραμμα 21. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=8.



Διάγραμμα 22. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει αναλογίας μαζών για pH=10.

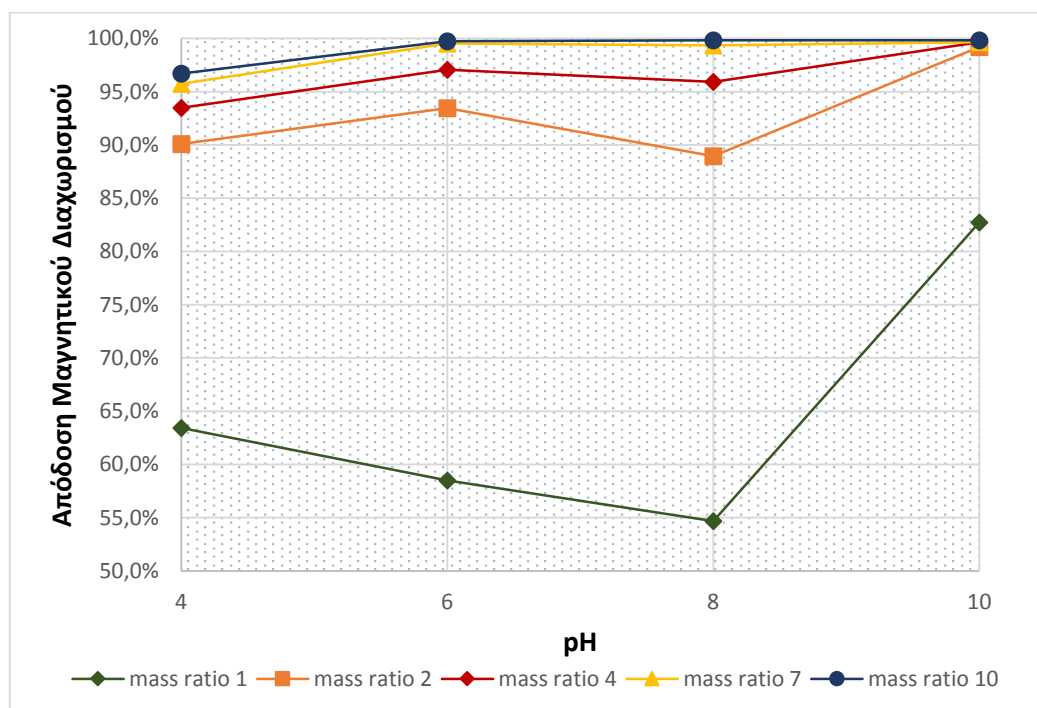
Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα, η απόδοση του διαχωρισμού, ανεξαρτήτως pH, αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας σωματιδίων προς τη βιομάζα. Το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, καθώς για μεγαλύτερη αναλογία μαζών, υπάρχουν περισσότερα σωματίδια για να συνδεθούν με τα κύτταρα και να τα διαχωρίσουν από το υδατικό μέσο. Τα πειραματικά αποτελέσματα εμφανίζουν μια λογική σειρά, καθώς κάθε πειραματικό σημείο με μεγαλύτερη αναλογία μαζών, εμφανίζει μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με το προηγούμενο.

Επίσης, σε κάθε τιμή pH η καμπύλη δείχνει να σταθεροποιείται σε διαφορετικό σημείο, και αυτό φανερώνει την επίδραση του pH στο διαχωρισμό. Σε pH=4, από αναλογία 2 και μετά, η απόδοση ξεπερνάει το 90%, ενώ παίρνει την

μέγιστη τιμή της 96,70% για αναλογία 10. Σε pH=6, για αναλογία 2 η απόδοση είναι μεγαλύτερη του 90% ενώ από αναλογία 6 και μετά ξεπερνάει το 99%. Όσο αναφορά το pH=8, η απόδοση εμφανίζεται μικρότερη για αναλογίες από 1-4 σε σχέση με το pH=6. Ωστόσο, από αναλογία 7 και μετά ξεπερνάει το 99%. Αντιθέτως, σε pH=10, από αναλογία 2 και μετά η απόδοση είναι μεγαλύτερη του 99%.

9.2.2.2 Επίδραση pH

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζεται η συμπεριφορά της απόδοσης του διαχωρισμού συναρτήσει του pH.



Διάγραμμα 23. Απόδοση διαχωρισμού συναρτήσει του pH, για διάφορες αναλογίες μαζών.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, το pH για αναλογίες μαζών μεγαλύτερες του 4 δεν επηρεάζει σημαντικά το διαχωρισμό, καθώς η απόδοση τείνει προς το 99%. Ωστόσο, έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά της καμπύλης της απόδοσης για αναλογίες μαζών 1, 2 και 4. Για αναλογία ίση με 2, η απόδοση αυξάνεται μέχρι pH 6, στη συνέχεια μειώνεται μέχρι το 8, για να αυξηθεί και πάλι έως το 10, όπου παίρνει τιμή μεγαλύτερη του 99%. Παρόμοια συμπεριφορά, παρατηρείται και για την αναλογία 4. Από εκεί και μετά, όσο αυξάνεται το pH αυξάνεται και η απόδοση. Ωστόσο, για αναλογία ίση με 1, η απόδοση από pH 4 έως 8 μειώνεται, ενώ από 8 μέχρι το 10 αυξάνεται. Η διαφορά εντοπίζεται στο pH 6, όπου για αναλογία μαζών 1, η απόδοση είναι χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη για pH 4, ενώ για τις υπόλοιπες αναλογίες είναι μεγαλύτερη.

9.2.2.3 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Από τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, προκύπτει ότι για αναλογίες μαζών μεγαλύτερες του 2 επιτυγχάνονται αποδόσεις μεγαλύτερες του 90% ανεξάρτητα της τιμής του pH, ενώ για αναλογίες μεγαλύτερες του 4 και pH μεγαλύτερο του 6 οι αποδόσεις ξεπερνούν το 95%.

9.3 Πιθανός μηχανισμός σύνδεσης σωματιδίων και κυττάρων

Οι μετρήσεις του δυναμικού zeta έδειξαν πως τα κύτταρα της βιομάζας *Nannochloropsis oceanica* που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκομιδή, ήταν αρνητικά φορτισμένα σε όλο το εύρος των τιμών pH που εξετάστηκαν, με μόνη εξαίρεση το pH 10, που ήταν ελαφρώς θετικά φορτισμένα. Από την άλλη μεριά, τα μαγνητικά σωματίδια από pH 4 έως 10 εμφανίζουν αρνητικό φορτίο. Από τους μηχανισμούς σύνδεσης που αναφέρθηκαν, η εξουδετέρωση φορτίου και η συμπίεση της εξωτερικής διπλοστοιβάδας συμβαίνουν όταν τα δύο σωματίδια έχουν αντίθετο φορτίο.

Στη διαδικασία της συγκομιδής που ακολουθήθηκε, τα σωματίδια και τα κύτταρα εμφανίζουν αντίθετο φορτίο, μόνο στην περίπτωση που το pH του υδατικού μέσου που γίνεται η συγκομιδή είναι ίσο με 10. Στο pH αυτό εμφανίζονται οι υψηλότερες αποδόσεις διαχωρισμού. Για τον λόγο αυτό, μπορεί να θεωρηθεί πως σε αυτή την τιμή του pH, πιθανός μηχανισμός πρόσδεσης είναι η εξουδετέρωση φορτίου και η συμπίεση της διπλοστοιβάδας. Ωστόσο, αν η σύνδεση των σωματιδίων ήταν το αποτέλεσμα μόνο των δύο μηχανισμών που αναφέρθηκαν, η απόδοση του μαγνητικού διαχωρισμού, θα έπρεπε να έπεφτε κατακόρυφα όσο μειωνόταν το pH. Τέτοιο φαινόμενο παρατηρείται μόνο για αναλογίες μαζών 1 και 2. Από εκεί και μετά, η απόδοση αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας μαζών, χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις μεταβολές του pH.

Έτσι, θα πρέπει να υπάρχει και κάποιος άλλος πιθανός μηχανισμός σύνδεσης, ο οποίος να είναι υπεύθυνος για τη σύνδεση των δύο ειδών όταν αυτά δεν είναι αντίθετα φορτισμένα. Η κροκίδωση δε φαίνεται να είναι ο ζητούμενος μηχανισμός, επειδή στηρίζεται στο σχηματισμό μεταλλικών οξειδίων και δεν είναι λειτουργική σε όξινες και ουδέτερες συνθήκες. Συνεπώς, ο πιθανός μηχανισμός σύνδεσης είναι η γεφύρωση. Τα μαγνητικά σωματίδια, προσροφώνται στην επιφάνεια των κυττάρων, και στη συνέχεια ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεγαλύτερα συσσωματώματα. Αυτός ο μηχανισμός δικαιολογεί και τις μεγάλες αποδόσεις που σημειώθηκαν σε pH 8, στο οποίο τα σωματίδια και τα κύτταρα έχουν την ίδια ηλεκτραρνητικότητα.

9.4 Συγκομιδή ελλείψει ενός θρεπτικού συστατικού

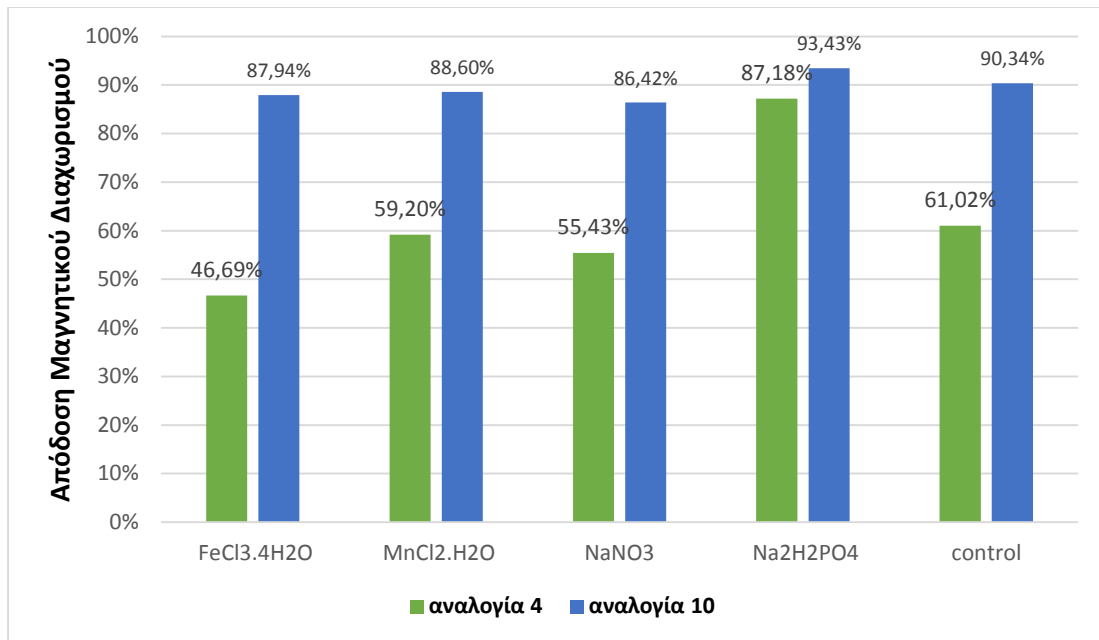
Η σύσταση του μέσου καλλιέργειας επηρεάζει σημαντικά το σχηματισμό συσσωματωμάτων μεταξύ σωματιδίων και βιομάζας, και κατά συνέπεια την ποσότητα των σωματιδίων που απαιτούνται για ένα επαρκή διαχωρισμό. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκε η επίδραση που έχει στο διαχωρισμό η απουσία ενός θρεπτικού συστατικού από το μέσο καλλιέργειας. Έτσι, χρησιμοποιώντας το ίδιο στέλεχος μικροάλγους και τις συνθήκες που αναφέρονται στην υποενότητα 8.1.1 και 8.1.2, αναπτύχθηκαν 4 διαφορετικές καλλιέργειες, καθεμιά από τις οποίες στερείται ενός θρεπτικού συστατικού, και 1 καλλιέργεια η οποία περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (control). Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της απουσίας κάθε θρεπτικού στην απόδοση του διαχωρισμού, ενώ υπάρχει και ένα μέτρο σύγκρισης με την κανονική καλλιέργεια.

Για χρόνο ανάδευσης 10 λεπτών και αριθμό στροφών 250 rpm, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για αναλογία μαζών 4 και 10 στο pH της κάθε καλλιέργειας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον μαγνητικό διαχωρισμό είναι αυτή που περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία για τη συγκομιδή της βιομάζας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Πειραματικά αποτελέσματα συγκομιδής ελλείψει ενός θρεπτικού συστατικού.

	FeCl ₃ .4H ₂ O	MnCl ₂ .H ₂ O	NaNO ₃	Na ₂ H ₂ PO ₄	control
pH	8,2	8,35	8,3	8,39	8,39
recovery %	46,69%	59,20%	55,43%	87,18%	61,02%
	87,94%	88,60%	86,42%	93,43%	90,34%

Όπως παρατηρείται και στον πίνακα, σε κάθε καλλιέργεια η απόδοση αυξάνεται όσο αυξάνεται η αναλογία μαζών. Το pH έχει πολύ μικρές διαφορές ανά καλλιέργεια και κυμαίνεται μεταξύ 8,2- 8,4. Για την καλύτερη απεικόνιση των διαφορών, τα πειραματικά δεδομένα τοποθετούνται και παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 24. Απόδοση μαγνητικού διαχωρισμού συναρτήσει της αναλογίας μαζών.

Η συμπεριφορά της απόδοσης είναι αναμενόμενη, καθώς όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, η αύξηση της αναλογίας μαζών επιφέρει αύξηση της απόδοσης του διαχωρισμού. Το pH στη συγκεκριμένη περίπτωση, δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το διαχωρισμό καθώς η τιμές του είναι παραπλήσιες. Κάθε καλλιέργεια εμφανίζει τις δικιές της αποδόσεις, τόσο για την χαμηλή αναλογία μαζών, όσο και για την υψηλή.

Για αναλογία 4, η χαμηλότερη απόδοση 46,69% εντοπίζεται στην καλλιέργεια που στερείται FeCl₃.4H₂O, ενώ η κανονική καλλιέργεια έχει απόδοση 61,02%. Από την άλλη μεριά, η υψηλότερη απόδοση εντοπίζεται στην καλλιέργεια που στερείται φωσφορικών ιόντων (Na₂H₂PO₄), η οποία αγγίζει το 87,18% και είναι 1,4 φορές μεγαλύτερη από την απόδοση της control.

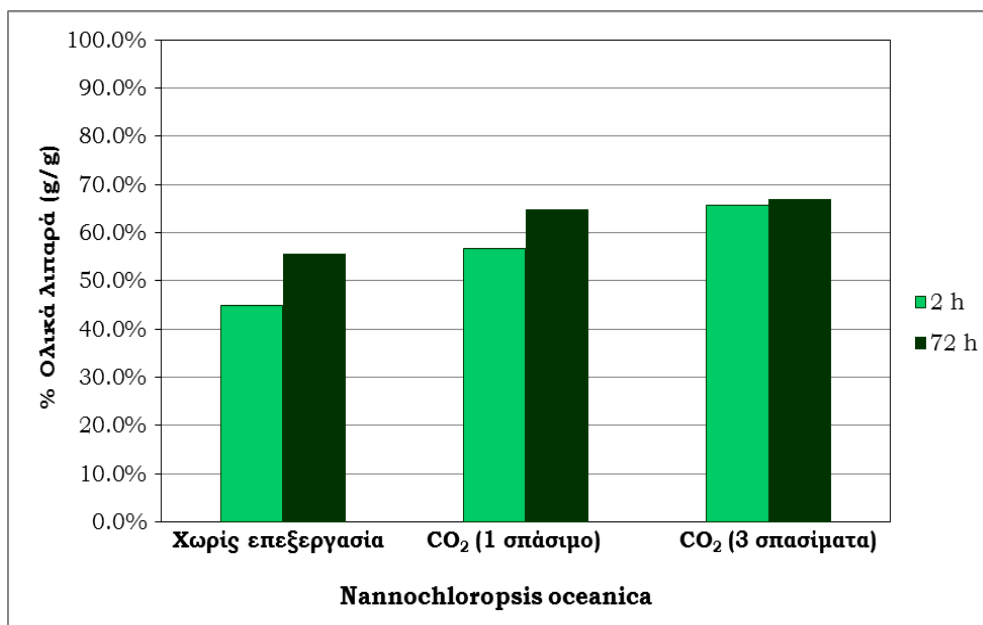
Για αναλογία 10, ο διαχωρισμός φτάνει σε υψηλότερα επίπεδα που φτάνουν κοντά στο 90%. Χαμηλότερη απόδοση αυτή τη φορά, έχει η καλλιέργεια που στερείται NaNO₃, ενώ η control έχει 90,34%. Η υψηλότερη απόδοση εντοπίζεται και πάλι στην καλλιέργεια που στερείται φωσφορικών ιόντων, η οποία είναι 93,43%.

9.4.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Η διαφορά των αποδόσεων στην υψηλή αναλογία ίσως δεν είναι τόσο σημαντική. Παρόλα αυτά, για αναλογία 4 η διαφορά μεταξύ της μεγαλύτερης απόδοσης και των υπολοίπων είναι αξιοσημείωτη. Συμπερασματικά, η καλλιέργεια από την οποία απουσιάζουν φωσφορικά ιόντα επιτυγχάνει ένα πιο αποδοτικό διαχωρισμό σε σχέση με την κανονική καλλιέργεια, για τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Παρόμοια συμπεριφορά έχει επισημανθεί και στη βιβλιογραφία [39].

9.5 Διάρρηξη κυττάρων με υπερκρίσιμο CO₂

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκχύλισης της βιομάζας του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica* που έχει υποστεί κυτταρική διάρρηξη με χρήση CO₂, όπως περιγράφεται στην §8.5. Η ποσότητα των λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν σε κάθε κύκλο αναφέρεται ως % ολικά λιπαρά/βιομάζα (g/g).



Διάγραμμα 25. Λιπιδικό περιεχόμενο του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica* συναρτήσει συνθηκών κυτταρικής διάρρηξης

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η εκχύλιση της βιομάζας που δεν έχει υποστεί επεξεργασία, εμφανίζει τις χαμηλότερες αποδόσεις ολικών λιπαρών. Η εκχύλιση των 2 ωρών κυμαίνεται στο 45% ενώ των 72 ωρών στο 55%. Η βιομάζας που έχει υποστεί ένα σπασίμο, παρουσιάζει μεγαλύτερες αποδόσεις. Στις 2 ώρες το ποσοστό ανάκτησης λιπαρών είναι μεγαλύτερο του 55% ενώ στις 72 ώρες είναι περίπου 64%. Στην τρίτη περίπτωση, η βιομάζα που έχει υποστεί 3 σπασίματα εμφανίζει αποδόσεις 66% και 68% για τις 2 και τις 72 ώρες αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι πως στην τρίτη περίπτωση, οι αποδόσεις έχουν πολύ μικρή διαφορά μεταξύ τους.

9.5.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Συμπερασματικά, γίνεται αντιληπτό ότι, η επεξεργασία με CO₂ οδηγεί στη λήψη μεγαλύτερων ποσοστών ολικών λιπαρών τόσο για τις 2 ώρες εκχύλισης όσο και για τις 72 ώρες. Επίσης, εάν πριν την εκχύλιση μεσολαβήσουν 3 σπασίματα, χρόνος εκχύλισης μεγαλύτερος των 2 ωρών δεν μεταβάλλει σημαντικά το αποτέλεσμα.

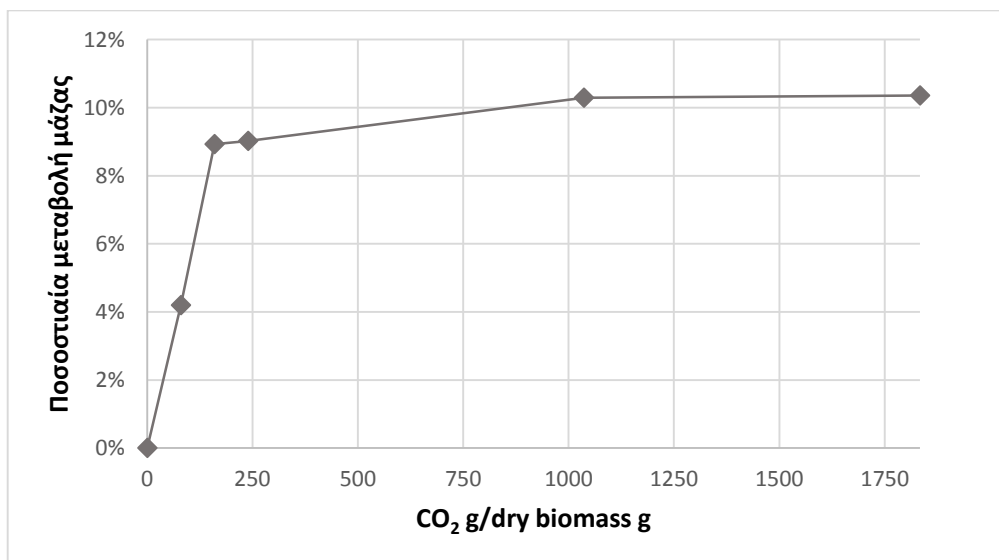
9.6 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα

Στη συσκευή εκχύλισης εισήχθησαν 4,0587 g ξηρής βιομάζας και μαγνητικών σωματιδίων, όπως περιγράφεται στην §8.7. Η περιεκτικότητα κατά βάρος της βιομάζας ήταν 10,3%. Η πίεση ρυθμίστηκε στα 250 bar και η θερμοκρασία του δοχείου εκχύλισης στους 40°C. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικοί κύκλοι διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης, όπως περιγράφεται στην §8.7. Ο χρόνος εκχύλισης ήταν 20 λεπτά, ενώ η ροή του CO₂ ρυθμιζόταν κάθε φορά στην επιθυμητή τιμή. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. Πειραματικά αποτελέσματα υπερκρίσιμης εκχύλισης.

α/α	χρόνος min	μεταβολή μάζας g	ροή CO ₂ g/min	ποσοστιαία μεταβολή μάζας
0	0	0	0,00	0,00%
1	20	0,01754	1,67	4,20%
2	40	0,01977	1,67	8,92%
3	60	0,00039	1,67	9,02%
4	80	0,00534	16,67	10,30%
5	100	0,00026	16,67	10,36%

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η ποσοστιαία μεταβολή μάζας συναρτήσει της αναλογίας CO₂ προς μάζα ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 26. Πειραματικά αποτελέσματα μεταβολής μάζας της βιομάζας συναρτήσει της ποσότητας του διαλύτη.

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, αρχικά η μάζα παρουσιάζει μείωση της τάξης του 9%, ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται στο 10,3%. Σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση διαδραματίζει η ροή του CO₂. Από την τρίτη εκχύλιση και μετά, η ροή δεκαπλασιάστηκε με σκοπό να εξεταστεί εάν, μια τέτοια ροή θα μπορούσε να εκχυλίσει μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων. Ωστόσο, δεν παρατηρείται μεγάλη

διαφορά μάζας, γεγονός που σημαίνει πως για τις συνθήκες αυτές εκχυλίστηκε όλη η δυνατή ποσότητα.

Για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην §8.7. Εισήχθησαν σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες 2,52247 g βιομάζας και μαγνητικών σωματιδίων και εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Folch. Η ποσότητα της βιομάζας υπολογίστηκε με βάση την περιεκτικότητά της στην αρχική ποσότητα. Τα αποτελέσματα της εκχύλισης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9. Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης με μέθοδο Folch.

	SFE+ Folch	Folch
αρχική ποσότητα (βιομάζα και μαγνητικά σωματίδια) (g)	2,52247	2,52247
Μάζα εκχυλίσματος (g)	0,037	0,0588
Μάζα βιομάζας (g)	0,2449	0,2449
Ποσοστό λιπιδίων	15,11%	24,01%

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, το ολικό ποσοστό λιπιδίων στην ποσότητα που εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Folch είναι 24%, το οποίο αντιστοιχεί σε 24 g λιπιδίων / 100 g ξηρής βιομάζας. Από την άλλη, το ποσοστό των λιπιδίων, που δεν εκχυλίστηκε κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση, είναι 15,11%. Δηλαδή 15,11 g λιπιδίων / 100 g ξηρής βιομάζας. Έτσι, με βάση τον τύπο, η απόδοση της υπερκρίσιμης εκχύλισης σε λιπιδικό περιεχόμενο είναι:

$$A \% = 100\% * \frac{Li - Lsfe}{Li} = 100\% * \frac{0,0588 - 0,037}{0,0588} = 37,07\%$$

9.6.1 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η υπερκρίσιμη εκχύλιση της βιομάζας σε πίεση 250 bar και θερμοκρασία 40 °C μπορεί να εκχυλίσει το 37% του συνολικού λιπιδικού περιεχομένου της βιομάζας. Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 9 g λιπιδίων/ 100 g ξηρής βιομάζας. Η ροή μάζας CO₂ δε φαίνεται να επηρεάζει την απόδοση. Ωστόσο, επηρεάζει το συνολικό χρόνο εκχύλισης.

Γίνεται κατανοητό πως οι συγκεκριμένες συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η υπερκρίσιμη εκχύλιση δεν είναι ικανές για να εκχυλιστεί όλο το λιπιδικό περιεχόμενο της βιομάζας. Σημαντική αύξηση της απόδοσης αναμένεται με χρήση εντονότερων συνθηκών εκχύλισης ή/και συνδιαλύτη.

10 Συμπεράσματα- Προτάσεις

Μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών μετρήσεων και του σχολιασμού των πειραματικών αποτελεσμάτων οδηγηθήκαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η συγκομιδή του μικροάλγους *Nannochloropsis oceanica* με χρήση μαγνητικών σωματιδίων, που παρασκευάστηκαν με επεξεργασία $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε μικροκύματα ήταν επιτυχημένη. Η παρασκευή των σωματιδίων είναι γρήγορη και αποδοτική, εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες μεθόδους σύνθεσης οξειδίων του σιδήρου.
2. Η αύξηση της αναλογίας σωματιδίων προς βιομάζα αυξάνει την απόδοση του μαγνητικού διαχωρισμού.
3. Η ανάκτηση της βιομάζας με τη χρήση των μαγνητικών σωματιδίων ξεπέρασε το 95% για αναλογία μαζών μεγαλύτερη του 4 και pH μεγαλύτερο του 6 με χρόνο ανάδευσης 10 λεπτών και 250 στροφές ανά λεπτό. Η συγκομιδή στο pH της καλλιέργειας, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 8 και 9, είναι προτιμητέα καθότι δεν απαιτείται η χρήση πρόσθετων ανόργανων χημικών ουσιών.
4. Ο πιθανός μηχανισμός πρόσδεσης των κυττάρων της βιομάζας και των μαγνητικών σωματιδίων είναι κατά κύριο λόγο η γεφύρωση και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
5. Η συγκομιδή της βιομάζας ελλείπει φωσφορικών αλάτων εμφανίζει υψηλότερη απόδοση σε σχέση με την κανονική καλλιέργεια, γεγονός που επιβεβαιώνεται και σε άλλες πειραματικές μετρήσεις της βιβλιογραφίας.
6. Για αύξηση της απόδοσης της διαδικασίας ανάκτησης των ενδοκυττάρων συστατικών είναι απαραίτητη η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Από τις μεθόδους που μελετήθηκαν ως πλέον κατάλληλη προτείνεται η εκτόνωση από υψηλή πίεση με χρήση υπερκρίσιμου CO_2 .
7. Η μέθοδος της υπερκρίσιμης εκχύλισης με καθαρό CO_2 για την ανάκτηση του λιπιδικού περιεχομένου στις σχετικά ήπιες συνθήκες εκχύλισης που εξετάστηκαν έδωσε περιορισμένα αποτελέσματα. Η χρήση συνδιαλύτη ή/ και η αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας αναμένεται να επιφέρει σημαντική βελτίωση της ανάκτησης.

Συνοψίζοντας, η συγκομιδή μικροαλγών με χρήση μαγνητικών σωματιδίων είναι αναμφίβολα μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος καθώς εξοικονομεί χρόνο και ενέργεια έναντι των υπόλοιπων μεθόδων συγκομιδής που χρησιμοποιούνται. Σε συνδυασμό με την εκτόνωση σε υψηλή πίεση για τη διάρρηξη των κυττάρων της βιομάζας και την υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO_2 μπορούν να αποτελέσουν μια πολύ καλή επιλογή για την αξιοποίηση των προϊόντων της βιομάζας των μικροαλγών.

11 Βιβλιογραφία

1. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.)
2. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
3. Gerardo, M. L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T., & Skill, S. C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, 11, 248-262.
4. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
5. Vilchez, C., Garbayo, I., Lobato, M. V., & Vega, J. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(8), 562-572.
6. Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1-14.
7. García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*, 115(1), 81-90.
8. Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51-59.
9. Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W. Kim., M.S Park & Yang, J. W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 31(6), 862-876.
10. Shelef, G., Sukenik, A., & Green, M. (1984). Microalgae harvesting and processing: a literature review (No. SERI/STR-231-2396). Technion Research and Development Foundation Ltd., Haifa (Israel).
11. Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102(1), 71-81.
12. Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, 2(1), 012701.
13. Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, 444-467.
14. Moraine, R. S., Sandbank, E., Bar-Moshe, Z., & Shvartzburd, L. (1980). Recovery of sewage-borne algae: flocculation, flotation, and centrifugation techniques. *Algae biomass: production and use* [sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.
15. Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology advances*, 20(7), 491-515.
16. Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313.

17. Bilad, M. R., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., & Vankelecom, I. F. (2012). Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. *Bioresource technology*, 111, 343-352.
18. Mohn, F. H. (1980). Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. *Algae biomass: production and use*/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.
19. Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
20. Wilde, E. W., Benemann, J. R., Weissman, J. C., & Tillett, D. M. (1991). Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process. *Journal of applied phycology*, 3(2), 159-167.
21. Chen, X., Huang, C., & Liu, T. (2012). Harvesting of microalgae *Scenedesmus* sp. using polyvinylidene fluoride microfiltration membrane. *Desalination and Water Treatment*, 45(1-3), 177-181.
22. Rossignol, N., Vandanjon, L., Jaouen, P., & Quemeneur, F. (1999). Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquacultural Engineering*, 20(3), 191-208.
23. Rios, S. D., Clavero, E., Salvadó, J., Farriol, X., & Torras, C. (2010). Dynamic microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(4), 2455-2460.
24. Matis, K. A., Gallios, G. P., & Kydros, K. A. (1993). Separation of fines by flotation techniques. *Separations Technology*, 3(2), 76-90.
25. Bare, W. R., Jones, N. B., & Middlebrooks, E. J. (1975). Algae removal using dissolved air flotation. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 153-169.
26. Aragón, A. B., Padilla, R. B., & de Ursinos, J. F. R. (1992). Experimental study of the recovery of algae cultured in effluents from the anaerobic biological treatment of urban wastewaters. *Resources, Conservation and Recycling*, 6(4), 293-302.
27. Mollah, M. Y., Morkovsky, P., Gomes, J. A., Kesmez, M., Parga, J., & Cocke, D. L. (2004). Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *Journal of hazardous materials*, 114(1), 199-210.
28. Azarian, G. H., Mesdaghinia, A. R., Vaezi, F., Nabizadeh, R., & Nematollahi, D. (2007). Algae removal by electro-coagulation process, application for treatment of the effluent from an industrial wastewater treatment plant. *Iranian Journal of Public Health*, 36(4), 57-64.
29. Poelman, E., De Pauw, N., & Jeurissen, B. (1997). Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources, conservation and recycling*, 19(1), 1-10.
30. Cerff, M., Morweiser, M., Dillschneider, R., Michel, A., Menzel, K., & Posten, C. (2012). Harvesting fresh water and marine algae by magnetic separation: screening of separation parameters and high gradient magnetic filtration. *Bioresource technology*, 118, 289-295.
31. Hu, Y. R., Wang, F., Wang, S. K., Liu, C. Z., & Guo, C. (2013). Efficient harvesting of marine microalgae *Nannochloropsis maritima* using magnetic nanoparticles. *Bioresource technology*, 138, 387-390.
32. Borlido, L., Azevedo, A. M., Roque, A. C. A., & Aires-Barros, M. R. (2013). Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology advances*, 31(8), 1374-1385.
33. Abdelaziz, A. E., Leite, G. B., & Hallenbeck, P. C. (2013). Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environmental technology*, 34(13-14), 1783-1805.

34. Farooq, W., Lee, Y. C., Han, J. I., Darpito, C. H., Choi, M., & Yang, J. W. (2013). Efficient microalgae harvesting by organo-building blocks of nanoclays. *Green Chemistry*, 15(3), 749-755.
35. Yoo, G., Yoo, Y., Kwon, J.-H., Darpito, C., Mishra, S.K., Pak, K., Park, M. S., Im, S.G., Yang, J.-W., 2014. An effective, cost-efficient extraction method of biomass from wet microalgae with a functional polymeric membrane. *Green. Chem.* 16, 312-319
36. Lee, Y. C., Huh, Y. S., Farooq, W., Chung, J., Han, J. I., Shin, H. J., S.W.Jeong, J. Lee, Y. Oh, Park, J. Y. (2013). Lipid extractions from docosahexaenoic acid (DHA)-rich and oleaginous *Chlorella* sp. biomasses by organic-nanoclays. *Bioresource technology*, 137, 74-81.
37. Vandamme, D., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in biotechnology*, 31(4), 233-239.
38. Zheng, B., Zhang, M., Xiao, D., Jin, Y., & Choi, M. M. (2010). Fast microwave synthesis of Fe₃O₄ and Fe₃O₄/Ag magnetic nanoparticles using Fe²⁺ as precursor. *Inorganic Materials*, 46(10), 1106-1111.
39. Prochazkova, G., Safarik, I., & Branyik, T. (2013). Harvesting microalgae with microwave synthesized magnetic microparticles. *Bioresource technology*, 130, 472-477.
40. Miller, S. M., Fugate, E. J., Craver, V. O., Smith, J. A., & Zimmerman, J. B. (2008). Toward understanding the efficacy and mechanism of *Opuntia* spp. as a natural coagulant for potential application in water treatment. *Environmental science & technology*, 42(12), 4274-4279.
41. Xu, L., Guo, C., Wang, F., Zheng, S., & Liu, C. Z. (2011). A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation. *Bioresource technology*, 102(21), 10047-10051.
42. Prochazkova, G., Podolova, N., Safarik, I., Zachleder, V., & Branyik, T. (2013). Physicochemical approach to freshwater microalgae harvesting with magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 213-218.
43. Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S., & Sun, S. (2010). Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Advanced Materials*, 22(25), 2729-2742.
44. Halim, R., Danquah, M. K., and Webley, P. A. (2012) Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnology Advances* 30, 709-732.
45. Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., and Wijffels, R. H. (2015) Cell disruption for microalgae biorefineries, *Biotechnology Advances* 33, 243-260.
46. Lee, A. K., Lewis, D. M., and Ashman, P. J. (2012) Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements, *Biomass and Bioenergy* 46, 89-101. R. Halim, M.K. Danquah, P.A. Webley, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 709-732
47. Kates, M. (1986). *Lipid extraction procedures. Techniques of lipidology.* Elsevier, Amsterdam, 100-111.
48. Medina, A. R., Grima, E. M., Giménez, A. G., & González, M. I. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 16(3), 517-580.
49. Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163(1), 2-24.
50. Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
51. Taylor, L. T. (1996). *Supercritical fluid extraction.* New York: John Wileys & Sons.

52. Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Krokida, M., & Magoulas, K. (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(3), 81-91.
53. Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K., & Krokida, M. (2014). Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*.
54. Lemonis, I., Tsimogiannis, D., Louli, V., Voutsas, E., Oreopoulou, V., & Magoulas, K. (2013). Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO₂ and liquid solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 48-53.
55. Perakis, C., Louli, V., Voutsas, E., & Magoulas, K. (2010). Supercritical CO₂ extraction of dittany oil: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(2), 573-578.
56. Perakis, C., Louli, V., & Magoulas, K. (2005). Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of food engineering*, 71(4), 386-393.
57. Louli, V., Folas, G., Voutsas, E., & Magoulas, K. (2004). Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *The Journal of supercritical fluids*, 30(2), 163-174.
58. Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource technology*, 92(2), 201-208.
59. Boukouvalas, C., Louli, V., & Magoulas, K. (2001). Bench-scale application of supercritical fluid extraction for the removal of phenol from aqueous solution. *Separation Science and Technology*, 36(10), 2279-2291.
60. Papamichail, I., Louli, V., & Magoulas, K. (2000). Supercritical fluid extraction of celery seed oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 18(3), 213-226.
61. Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(20), 4667-4675.
62. Ikushima, Y., Saito, N., Hatakeda, K., Ito, S., Asano, T., & Goto, T. (1986). A supercritical carbon dioxide extraction from mackerel (*scomber japonicus*) powder: Experiment and modeling. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 59(12), 3709-3713.
63. Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., & Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*, 223(6), 787-790.
64. Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., Farid, M., & Tariq, S. (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: process optimization and laboratory scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, 86, 57-66.
65. Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragan, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., Mendes R.L., Sovova H., Gouveia, L. (2013). A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga—extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource technology*, 135, 128-136.
66. Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.