



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

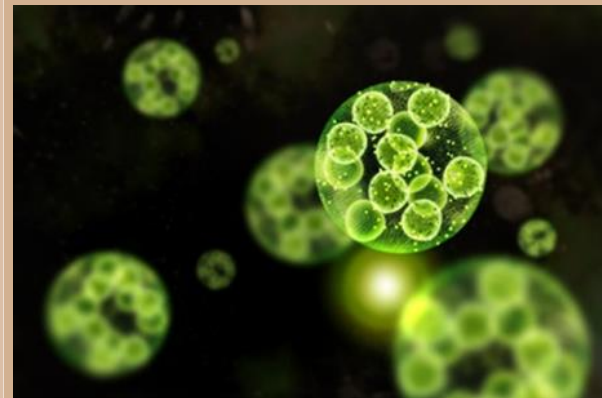
**ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ
ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ *Chlorella pyrenoidosa* ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΠΑΛΜΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΙΚΩΝ ΠΕΔΙΩΝ**

ΣΤΑΘΗ ΣΟΦΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ
Καθηγητής Ε.Μ.Π.**

Αθήνα, 2021



Νυνὶ δὲ μένει πίστις, ἐλπίς, ἀγάπη, τὰ τρία ταῦτα· μείζων δὲ τούτων ἡ ἀγάπη. Ἡ ἀγάπη μακροθυμεῖ, χρηστεύεται, ἡ ἀγάπη οὐ ζηλοῖ, ἡ ἀγάπη οὐ περπερεύεται, οὐ φυσιοῦται, οὐκ ἀσχημονεῖ, οὐ ζητεῖ τὰ ἑαυτῆς, οὐ παροξύνεται, οὐ λογίζεται τὸ κακόν, οὐ χαίρει τῇ ἀδικίᾳ, συγκαίρει δὲ τῇ ἀληθείᾳ· πάντα στέγει, πάντα ἐλπίζει, πάντα ὑπομένει.

Αφιερωμένο στην ἐλπίδα για ἓναν καλύτερο κόσμο και στην ἀγάπη, καθὼς ἡ μὀρφωση του μυαλοῦ χωρὶς τὴ μὀρφωση τῆς καρδιάς δεν εἶναι καθόλου μὀρφωση.

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τη διπλωματική εργασία της προπτυχιακής φοιτήτριας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, Στάθη Σοφίας. Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Πέτρου Ταούκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία. Σε δύσκολες συνθήκες, πανδημίας και πίεσης, μου έδωσε την ευκαιρία να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και να αποκτήσω το δίπλωμά μου. Η καθοδήγησή του, οι γνώσεις και οι υποδείξεις του ήταν πολύτιμες καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον υποψήφιο Διδάκτορα Κατσιμίχα Αλέξανδρο, συντονιστή της παρούσας μελέτης, καθώς και τους υποψήφιους Διδάκτορες Δημόπουλο Γεώργιο και Λημναίο Αθανάσιο για την πολύτιμη βοήθειά τους από την αρχή των πειραμάτων μέχρι και το τέλος της συγγραφής της εργασίας, για τις συμβουλές, την υποστήριξη που μου προσέφεραν, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Δημήτριο Τσιμογιάννη για τις υποδείξεις του και την καθοδήγηση που μου προσέφερε στον αρχικό σχεδιασμό αλλά και στην ακόλουθη πορεία της πειραματικής διαδικασίας. Σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων θα ήθελα επίσης να πω ένα θερμό ευχαριστώ για το πρόσχαρο κλίμα συνεργασίας και ομαδικότητας.

Μεταξύ όλων θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συμφοιτητές μου για την υπέροχη πενταετία της φοίτησής μου, καθώς και την οικογένειά μου που με στήριζε και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα, οδηγώντας με στο επίπεδο που βρίσκομαι σήμερα. Κάθε μου επιτυχία, επιτυχία τους.

Σε όλους εσάς ...

Ευχαριστώ!

*Στάθη Σοφία,
Οκτώβριος 2021*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η ανάγκη για λειτουργικά συστατικά τροφίμων φυσικής προέλευσης έχει σημειώσει κατακόρυφη αύξηση, με την βιομηχανία τροφίμων να αποσκοπεί στην εύρεση οικονομικά βιώσιμων λύσεων για την παραγωγή ασφαλών βιοδραστικών συστατικών. Αναγνωρισμένη πηγή πολύτιμων συστατικών με υψηλή διατροφική και βιολειτουργική αξία αποτελούν τα μικροφύκη. Πρόκειται για φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που αναπτύσσονται σε αλμυρά ή γλυκά νερά και εμπεριέχουν σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών. Το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, του γένους των χλωροφυκών, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο μικροφύκος στην βιομηχανία τροφίμων για την διατροφική του αξία και τις βιοδραστικές ιδιότητες των συστατικών του. Συγκεκριμένα, πρόκειται για έναν μονοκύτταρο μικροοργανισμό, με σχήμα σφαιρικό. Είναι πλούσια πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών και χρωστικών και αντιοξειδωτικών ουσιών, με κύριες τις χλωροφύλλες και τη λουτεΐνη.

Η ανάκτηση αυτών των συστατικών έχει μεγάλη σημασία για την εφαρμογή τους, εφόσον το σκληρό και ανθεκτικό κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών εμποδίζει την έκφραση της βιολειτουργικής τους δράσης. Προκειμένου να εκχυλιστούν αυτά τα συστατικά, απαραίτητη είναι η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης που τα περιβάλλει, αλλά και των μεμβρανών των οργανιδίων που μπορεί να περιέχονται. Προκειμένου να διαρρηχθούν αυτά τα εμπόδια, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης οι οποίες μπορούν να διακριθούν σε θερμικές και μη θερμικές. Αυτές διαρρηγνύοντας ή και καταστρέφοντας τη δομή του τοιχώματος και των μεμβρανών των κυττάρων, καθιστούν τα κύτταρα πιο διαπερατά, αυξάνοντας την εκχυλισιμότητα. Κύριο μειονέκτημα των θερμικών μεθόδων έναντι των μη θερμικών, είναι η αλλοίωση θερμικά ευαίσθητων συστατικών και η χρήση οργανικών διαλυτών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή τοξικότητα και επικινδυνότητα. Μη θερμικές μέθοδοι διάρρηξης, που χαρακτηρίζονται από επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον είναι η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μια μηχανική, μη θερμική μέθοδος, η οποία προκαλεί τη θραύση των κυττάρων με την άσκηση υψηλών πιέσεων στο κυτταρικό αιώρημα. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία περιλαμβάνει την εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης συνεχούς ρεύματος, εντός ενός μέσου, το οποίο είναι τοποθετημένο μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι διεργασίες αυτές χρησιμοποιούνται ως προκατεργασίες της

ανάκτησης ενδοκυτταρικών συστατικών, ώστε να αυξήσουν την απόδοση μειώνοντας το κόστος και τον χρόνο της εκχύλισης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε χρήση της ξηρής βιομάζας του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* και μελετήθηκε η διεργασία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων σε διαφορετικές συνθήκες ειδικής ενέργειας (76.0, 138.7 και $220.0 \frac{kJ}{kg}$ που αντιστοιχούν σε 300,600 και 1000 παλμούς), για την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων. Για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας της βιομάζας σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή χρησιμοποιήθηκε η διεργασία της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, λόγω της πλήρους καταστροφής της δομής του κυτταρικού τοιχώματος που μπορεί να επιτευχθεί (800 bar, 10 διελεύσεις). Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιλέχθηκε λόγω της δημιουργίας πόρων, που επιφέρει στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, δεδομένου ότι απελευθερώνεται το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, χωρίς να αλλοιώνεται η σύσταση των συστατικών των κυττάρων.

Στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, παρασκευάστηκε αιώρημα 5 % w/w με χρήση ξηρής βιομάζας του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Σε 95 mL νερού προστέθηκαν 5 g ξηρής βιομάζας. Αυτό υπέστη επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία και στη συνέχεια οδηγήθηκε προς εκχύλιση, αναδιαλύοντας την επεξεργασμένη βιομάζα σε διαλύματα αιθανόλης σε νερό περιεκτικότητας 95, 85 και 75% v/v σε αιθανόλη. Η εκχύλιση των επεξεργασμένων και ανεπεξέργαστων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο υπό συνεχή ανάδευση σε 170 rpm και σε θερμοκρασίες εκχύλισης 30, 45 και 60 °C, για χρονική διάρκεια έως και 6 h.

Αρχικά, έγινε μαθηματική μοντελοποίηση της ανάκτησης των χλωροφυλλών με τη χρήση της εξίσωσης-μοντέλου : $C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$. Έτσι, μελετήθηκε το μέγιστο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών, εκφρασμένο σε $\frac{mg \text{ ανακτημένων χλωροφυλλών}}{100 mg \text{ ολικών χλωροφυλλών της βιομάζας}}$. Βρέθηκε ότι, τόσο η θερμοκρασία επώασης, η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη, όσο και η προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επηρέασαν σημαντικά το τελικό ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών, με αυτό να φτάνει στην θερμοκρασία των 60°C, περιεκτικότητα σε αιθανόλη 95 % v/v και στους 1000 παλμούς ποσοστό $99.4 \pm 2.6 \frac{mg \text{ ανακτημένων χλωροφυλλών}}{100 mg \text{ ολικών χλωροφυλλών της βιομάζας}}$, έναντι του $23.1 \pm 0.4 \frac{mg \text{ ανακτημένων χλωροφυλλών}}{100 mg \text{ ολικών χλωροφυλλών της βιομάζας}}$, το οποίο ανακτήθηκε σε ανεπεξέργαστο δείγμα, η εκχύλιση του οποίου έγινε σε διαλύτη 75 % περιεκτικότητας σε αιθανόλη και σε T = 30°C.

Έπειτα, το εκχύλισμα μελετήθηκε ως προς την συνολική αντιοξειδωτική του ικανότητα, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), η οποία εκφράστηκε σε ισοδύναμα trolox ($\frac{mg\ trolox}{g\ ξηρής\ βιομάζας}$) και μοντελοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης –μοντέλου: $TEAC = TEAC_e - (TEAC_e - TEAC_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{TEAC}}}$. Έτσι, εξετάστηκε η επίδραση των επιμέρους παραμέτρων της εκχύλισης στην παράμετρο $TEAC_e$, η οποία αναφέρεται στην τελική αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος, μετά το πέρας των 6 ωρών επώασης. Μέγιστο εμφανίστηκε σε θερμοκρασία 60°C περιεκτικότητας 95 % σε αιθανόλη στους 1000 παλμούς και ίσο με $3.22 \pm 0.04 \frac{mg\ ισοδύναμων\ trolox}{g\ ξηρής\ βιομάζας}$. Αυξανόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη, αλλά και με αύξηση των εφαρμοζόμενων παλμών, η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξανόταν, επίσης, σημαντικά. Αναφορικά με τη θερμοκρασία, η επίδραση αυτής ποσοτικοποιήθηκε με την εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην παράμετρο $TEAC_e$. Η ενέργεια ενεργοποίησης, ωστόσο, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές, αν συγκριθούν τα ανεπεξέργαστα με τα επεξεργασμένα, με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, κύτταρα.

Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στο ποσοστό της λουτεΐνης, που ανακτήθηκε από την εκχύλιση του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, της περιεκτικότητας σε αιθανόλη καθώς και με την αύξηση των παλμών που εφαρμόζονταν στην μέθοδο με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, αυξανόταν και το ποσοστό της εκχυλισμένης λουτεΐνης, προσδίδοντας μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στο εκχύλισμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η επιλεκτικότητα της εκχύλισης ως προς τις χλωροφύλλες μεταξύ τους, αλλά και ως προς τη λουτεΐνη έναντι των χλωροφυλλών C_α και C_β . Για να γίνει αυτό μετρήθηκαν οι λόγοι $\frac{C_\alpha}{C_\beta}$ και $\frac{lut}{C_\alpha + C_\beta}$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη μείωση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, ο λόγος $\frac{C_\alpha}{C_\beta}$ μειώνεται, παρατηρείται, δηλαδή, αύξηση της χλωροφύλλης β στο εκχύλισμα. Αυτό συμβαίνει, λόγω της ευδιαλυτότητας της χλωροφύλλης β στο νερό, εξαιτίας της παρουσίας φορμυλομάδας στο μόριο της. Ο λόγος, $\frac{lut}{C_\alpha + C_\beta}$ από την άλλη αυξάνεται με τη μείωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή 1.07 ± 0.03 στους 1000 παλμούς PEF, σε θερμοκρασία 60°C και περιεκτικότητα 75 % σε αιθανόλη. Αξίζει να αναφερθεί πως στην θερμοκρασία των 60°C και τη χαμηλή περιεκτικότητα 75 % σε αιθανόλη κατ' όγκο, υπάρχει ο κίνδυνος υποβάθμισης των χλωροφυλλών, λόγω της θερμότητας και της παρουσίας νερού σε ποσοστό ανώτερο του 10

% στο διαλύτη. Στην ίδια συνθήκη και για παλμούς υψηλότερους των 300, το εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε λουτεΐνη, η οποία έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση.

Έντονη επίδραση είχε η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην μείωση του χρόνου t_{95} . Ο χρόνος t_{95} είναι ο χρόνος κατά τον οποίο το ποσοστό ανάκτησης των χλωροφυλλών ή των ισοδυνάμων trolox, ισούται με το 95 % του C_e ή $TEAC_e$ αντίστοιχα, σχετιζόμενα με τις αντίστοιχες μεταβλητές C_e ή $TEAC_e$ μίας εκχύλισης αναφοράς (δείγματα control).

Τέλος, μετρήθηκαν τα ξηρά βάρη των εκχυλισμάτων, ύστερα από ξήρανση στους 100°C και παραμονή τους εκεί για 24 h. Παρατηρήθηκε ότι στο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος επιδρά μόνο η θερμοκρασία σαν παράμετρος της εκχύλισης. Η σύσταση του διαλύτη σε αιθανόλη και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία βρέθηκε πως δεν επηρεάζουν το ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων. Αυτό διαπιστώθηκε ότι συμβαίνει λόγω της συμπαράσυρσης στο εκχύλισμα και άλλων συστατικών πέραν των φυσικών χρωστικών που μελετώνται. Το γεγονός αυτό μεταφράζεται στην παραλαβή πλουσιότερων εκχυλισμάτων στα συστατικά που μελετήθηκαν, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης, η μέθοδος των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων σε αιωρήματα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, μπορεί να συνεισφέρει είτε στη μείωση της θερμοκρασίας εκχύλισης, είτε στην μείωση της περιεκτικότητας του διαλύτη εκχύλισης σε αιθανόλη. Η συνθήκη των 1000 παλμών, η εκχύλιση στους 60 °C και χρήση διαλύτη 95% σε αιθανόλη επέφεραν τη μέγιστη ανάκτηση χλωροφυλλών (~100%). Σχετικά με τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών (~80%) προέκυψε με χρήση διαλύτη 95 % σε αιθανόλη και θερμοκρασίας εκχύλισης 60 °C. Προκειμένου να επιτευχθεί πρακτικά ίδιο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών με το μέγιστο ποσοστό από τα ανεπεξέργαστα κύτταρα, η εφαρμογή των 600 παλμών στην επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία έδωσε τη δυνατότητα είτε της μείωσης της θερμοκρασίας στους 45 °C, με διατήρηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης σε 95 % v/v, είτε τη μείωση της περιεκτικότητας σε 85 % v/v, με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 60 °C.

Αναφορικά με τη λουτεΐνη, ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού ανάκτησης αυτής (~95%) στο εκχύλισμα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, ήταν η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία με 1000 παλμούς, σε θερμοκρασία εκχύλισης 60°C και χρήση διαλύτη 95% σε αιθανόλη. Στα ανεπεξέργαστα κύτταρα, το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης λουτεΐνης (~67%), παρατηρήθηκε στους 60°C με

χρήση αιθανόλης 95%. Έτσι, με σκοπό να ανακτηθεί πρακτικά το ίδιο ποσοστό λουτεΐνης, διερευνήθηκαν τα ποσοστά ανάκτησης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Διαπιστώθηκε, ότι η επεξεργασία με 300 παλμούς, όπου το ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης έφτασε το 66 %, θα μπορούσε να συνδυαστεί είτε με θερμοκρασία εκχύλισης ίση με 45°C και χρήση αιθανόλης 95%, είτε με θερμοκρασία 60°C και ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη 85%. Επίσης, η εφαρμογή 600 παλμών, με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 60°C και μείωση της περιεκτικότητας σε 75 % αιθανόλης, οδήγησε σε πρακτικά ίδια απόδοση λουτεΐνης.

Τέλος, η εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων αύξησε σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Με την εφαρμογή 1000 παλμών, σε θερμοκρασία 60°C και χρήση αιθανόλης 95 % v/v, η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε κατά 18 % (από 2.72 σε 3.22 mg Trolox/g ξηρής βιομάζας). Συγκριτικά με τα παραπάνω, οι προτεινόμενες συνθήκες επεξεργασίας και εκχύλισης για την βέλτιστη ανάκτηση χλωροφυλλών ως προς τα ανεπεξέργαστα κύτταρα (600 παλμοί, 45°C, 95% αιθανόλη και 600 παλμοί, 60°C, 85% αιθανόλη) και λουτεΐνης (300 παλμοί, 45°C, 85% αιθανόλη), επέφεραν αντιοξειδωτικές ικανότητες 2.78 και 2.63 mg Trolox/g ξηρής βιομάζας, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, η επεξεργασία της βιομάζας *Chlorella pyrenoidosa* με παλμικά ηλεκτρικά πεδία έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την εκχύλιση κύριων βιοδραστικών συστατικών είτε αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης, είτε μειώνοντας την περιεκτικότητα αιθανόλης και τη θερμοκρασία εκχύλισης, επιφέροντας μείωση του κόστους της διεργασίας. Η κλιμάκωση της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα είναι πρακτικά υποσχόμενη καθώς ο εξοπλισμός παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι διαθέσιμος και εφαρμόζεται σε τέτοια κλίμακα. Σε μια τέτοια κλιμάκωση η μείωση κόστους υλικών, η εξοικονόμηση ενέργειας και χρόνου και η φιλικότητα προς το περιβάλλον θα πρέπει να επιβεβαιωθούν ποσοτικά με τεχνοοικονομική ανάλυση και ανάλυση κύκλου ζωής και αναμένονται σημαντικά.

Recovery of bioactive compounds from microalgae *Chlorella pyrenoidosa* by applying pulsed electric fields

In recent years, the need of functional food ingredients has grown rapidly. The food industry is aiming to find cost-effective solutions for the production of safe and bioactive food ingredients. Microalgae are a recognized source of valuable ingredients with high nutritional and bio-functional value. Microalgae are photosynthetic microorganisms that grow in salt or fresh water and contain significant amounts of polyunsaturated fatty acids, proteins and antioxidants. *Chlorella pyrenoidosa*, a genus of chlorophyta, is widespread in the food industry for its nutritional value and bioactive properties of its constituents. Specifically, it is a single-celled microorganism, oval in shape. It is rich in proteins, phenolic acids, vitamins, chlorophylls (α and β) and carotenoids, mainly in lutein.

The recovery of these components is of great importance for their application, since the hard and resilient cell wall of the microalgae prevents the expression of their biofunctional action. In order to extract these components, it is necessary to disrupt the cell wall and the membrane that surrounds them, as well as the membranes of the organelles that may be contained. In order to break down these barriers, various methods of cell disruption have been developed which can be categorized into thermal and non-thermal. By disrupting or destroying the structure of the cell wall and membranes, the cells become more penetrable, increasing the extraction of the internal components. The main disadvantage of thermal methods over non-thermal ones is the corruption of thermally sensitive components and the use of organic solvents, which are characterized by high toxicity and hazard. Non-thermal disrupting methods, characterized by scientific and industrial interest, are the homogenization of high pressure and pulsed electric fields. High pressured homogenization is a mechanical, non-thermal method, which causes the disruption of cells, by applying high pressures on the cell surface. Pulsed electric field (PEF) involves the application of high voltage electric pulses, in a medium, which is placed between two electrodes, resulting in the creation of pores on the cell surface. These processes are used as pretreatments for the recovery of intracellular components, in order to increase efficiency by reducing the cost and time of extraction.

In this diploma thesis, dry biomass of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* was used and the process of pulsed electric fields was studied, (conditions of specific energy 76.0, 138.7 and 220.0 kJ / kg corresponding to 300, 600 and 1000 pulses respectively), in order to increase cell

penetrability. The process of high pressure homogenization was used to determine the total biomass content in chlorophylls and carotenoids, due to the complete cell wall destruction that can be achieved (P=800 bar, 10 passes). Pulsed electric fields treatment was chosen because of the creation of pores on the membrane of the *Chlorella pyrenoidosa* cells and of the release of intracellular contents, in combination with the maintenance of cell morphology.

In the Laboratory of Food Chemistry and Technology, a 5 % w / w suspension was prepared, by adding 5 g of dry biomass of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* to 95 mL of water. This was treated with pulsed electric fields and then extracted, dissolving the treated biomass in solvents containing 95 %, 85 % and 75% v / v ethanol. The extraction of the treated and untreated samples was performed in a water bath with continuous stirring at 170 rpm and at extraction temperatures of 30, 45 and 60 °C, for a period of 6 hours.

Initially, the recovery of chlorophylls was mathematically modeled using the following equation: $C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$. In this way, the maximum percentage of recovered chlorophyll was studied, expressed in $\frac{\text{mg of recovered chlorophylls}}{100 \text{ mg of total chlorophylls of dry biomass}}$ %. It was found that both the incubation temperature and the ethanol content of the solvent, as well as the pulsed electric field pretreatment significantly affected the final chlorophyll recovery rate. At 60°C, 75 % content in ethanol and 1000 pulses this rate reached $99.4 \pm 2.6 \frac{\text{mg of recovered chlorophylls}}{100 \text{ mg of total chlorophylls of dry biomass}}$, versus $23.1 \pm 0.4 \frac{\text{mg of recovered chlorophylls}}{100 \text{ mg of total chlorophylls of dry biomass}}$, which was recovered in a control sample, extracted with a solvent of 75% ethanol content and at T = 30 °C.

Then, the extract was studied for its trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC, which was expressed in trolox equivalents $\left(\frac{\text{mg of trolox}}{\text{g of dry biomass}}\right)$, and it was modelled using the equation: $TEAC = TEAC_e - (TEAC_e - TEAC_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{TEAC}}}$. Thus, the effect of the individual extraction parameters was examined, as regards to the final antioxidant capacity of the extracts, after the six hours of incubation. The maximum occurred at 60°C, 95 % v/v content in ethanol of the solvent and with a treatment of 1000 pulses, equal to $3.22 \pm 0.04 \frac{\text{mg trolox}}{\text{g dry biomass}}$. As the ethanol content of the solvent was increased, in addition to the increased pulses applied, the trolox antioxidant capacity was also significantly increased. The effect of temperature was studied and quantified by applying the Arrhenius equation to the parameter $TEAC_e$.

However, the activation energy did not show statistically significant differences in the treated with pulsed electric fields cells in comparison to the untreated ones.

Lutein is the main carotenoid of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. In order to determine and measure this, the diluted samples were imported in the high performance liquid chromatography apparatus. The areas of the first peaks of the chromatogram, obtained at 443 nm, were equal to the amounts of recovered lutein. This amount was increased in proportion to the extraction parameters.

The selectivity of the extraction in terms of chlorophylls among themselves, but also in terms of lutein against chlorophylls is of great interest. In order to examine the effect of the parameters of the extraction on this selectivity, the ratios $\frac{C\alpha}{C\beta}$ and $\frac{lut}{C\alpha+C\beta}$ were measured. The parameters *lut*, $C\beta$ and $C\alpha$ correspond to the areas of the first, second and third peaks of the chromatogram at 443 nm, respectively. The results demonstrated that with the decreasing of the ethanol content in the solvent of the extraction, the $\frac{C\alpha}{C\beta}$ ratio was decreased as well, indicating an increase of chlorophyll b in the extract with 75% content, compared to the corresponding amount in the extracts with 95% and 85% ethanol content. This happened due to the solubility of chlorophyll b in water, because of the presence of a formyl group in its molecule. The ratio $\frac{lut}{C\alpha+C\beta}$ on the other hand, was increased with the decreasing of the ethanol content of the solvent, reaching the maximum value of 1.07 ± 0.03 in the condition PEF1000, at a temperature of 60 °C and a content of 75% ethanol. It is worth mentioning that at a temperature of 60 °C and at a low content of 75% by volume of ethanol, there is a risk of degradation of chlorophyll due to heat released of the procedure and the presence of water at a rate of more than 10% in the solvent. Under the same conditions and for pulses higher than 300, the extract was rich in antioxidants, hence lutein, as lutein imparts antioxidant activity to the extract.

The treatment with pulsed electric fields had a strong effect in reducing the time t_{95} . The parameter t_{95} is the time at which the recovered chlorophylls, and trolox equivalents, equal to 95% of the amounts C_e or $TEAC_e$ respectively, related to C_e or $TEAC_e$ variables of the reference extraction (control samples).

Finally, the dry weights of the extracts were measured, after drying them in an oven at 100 °C and let them there for 24 h. It was observed that only the temperature, as a parameter of the extraction, affects the dry weight of the extracts. The composition of the solvent in ethanol

and the pulsed electric fields treatment did not affect the dry weight of the extracts. This might have happened due to the enhancement of the extract with components other than the natural pigments, being studied. This translates into the receiving of richer extracts in the components studied only using pulsed electric field technology.

Based on the results of the study, the method of pulsed electric fields in suspensions of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*, can contribute either to the reduction of the extraction temperature or to the reduction of the content of the extraction solvent in ethanol. The condition of 1000 pulses, extraction at 60°C and use of 95% solvent in ethanol resulted in maximum chlorophyll recovery (~ 100%). Regarding the untreated cells, the maximum chlorophyll recovery rate (~ 80%) was obtained using a 95% solvent in ethanol and an extraction temperature of 60 °C. In order to achieve practically the same percentage of recovered chlorophyll as the maximum percentage of untreated cells, the application of 600 pulses in pulsed electric field treatment made it possible to either reduce the temperature to 45 °C, while maintaining the ethanol content at 95% v / v, or reducing the content to 85% v / v, while maintaining the temperature at 60 °C.

Regarding lutein, the optimal combination of conditions for achieving the maximum recovery rate (~ 95%) in the extract of *Chlorella pyrenoidosa* microalgae was the treatment with pulsed electric fields with 1000 pulses, at an extraction temperature of 60 ° C and the use of solvent 95 % in ethanol. In untreated cells, the maximum recovery rate of lutein (~ 67%) was observed at 60 °C using 95% ethanol. Thus, in order to recover practically the same percentage of lutein, recovery rates were investigated, as derived from the application of pulsed electric fields. It was found that the treatment with 300 pulses, where the percentage of recovered lutein reached 66%, could be combined either with an extraction temperature of 45 °C and the use of 95% ethanol, or with a temperature of 60 °C and an ethanol content of the solvent of 85%. Also, the application of 600 pulses, by maintaining the temperature at 60 ° C and reducing the content to 75% ethanol, resulted in practically the same yield of lutein.

Finally, the application of pulsed electric fields significantly increased the antioxidant capacity of the extracts. By applying 1000 pulses, at a temperature of 60 °C and using 95% v / v ethanol, the antioxidant capacity was increased by 18% (from 2.72 to 3.22 mg Trolox / g dry biomass). Compared to the above, the proposed processing and extraction conditions for the optimal recovery of chlorophyll in terms of untreated cells (600 pulses, 45 °C, 95% ethanol and 600 pulses, 60 °C, 85% ethanol) and lutein (300 pulses, 45 °C, 85% ethanol), had antioxidant capacities of 2.78 and 2.63 mg Trolox / g dry biomass, respectively.

In conclusion, treatment of *Chlorella pyrenoidosa* biomass with pulsed electric fields has the potential to improve the extraction of major bioactive components either by increasing the extraction efficiency or by reducing the ethanol content and extraction temperature, thereby reducing the process cost. The scaling of the process on an industrial scale is practically promising, as the pulsed electric field equipment is available and can be applied on such a scale. In such an escalation the reduction of material costs, energy and time savings as well as the environmental friendliness should be quantified with techno-economic and life cycle analysis and they are expected to be significant.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Μικροφύκη	1
1.1 Εισαγωγή	2
1.2 Ταξινόμηση μικροφυκών	4
1.2.1 Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria, Cyanophyceae, Blue green algae)	4
1.2.2 Διάτομα (Bacillariophyceae ή Diatomeae)	5
1.2.3 Δινοφύκη, δινομαστιγωτά, πυρροφύκη (Dinophyceae, Dinoflagellates)	6
1.2.4 Χλωροφύκη (Chlorophyta, Chlorophyceae, Green algae)	7
1.2.5 Χαροφύκη (Charophyta)	8
1.2.6 Ροδοφύκη (Rhodophyta, Rhodophyceae, Red algae)	9
1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών	10
1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών	12
1.4.1 Ανοιχτού τύπου καλλιέργειες	12
1.4.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες	14
1.4.3 Φωτοτροφική καλλιέργεια	16
1.4.4 Ετερότροφη καλλιέργεια	17
1.4.5 Μιξότροφη καλλιέργεια	17
1.4.6 Φωτοετερότροφη καλλιέργεια	18
1.4.7 Σύγκριση συνθηκών καλλιέργειας	18
1.5 Χρήσιμα συστατικά που εξάγονται από μικροφύκη	19
1.5.1 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία	19
1.5.2 Λιπίδια	20
1.5.3 Πρωτεΐνες	21
1.5.4 Πολυσακχαρίτες	22
1.5.5 Φαινολικά οξέα και φαινολικές ενώσεις	23
1.5.6 Χρωστικές ουσίες	24
1.5.6.1 Χλωροφύλλες	24
1.5.6.2 Καροτενοειδή	25
1.6 Ξήρανση μικροφυκών	29
1.7 Σύνοψη	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	31
2.1 Δομή και λειτουργία του κυττάρου του μικροφύκου <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	32
2.1.1 Μορφολογία κυττάρου	32
2.1.2 Πυρήνας	33

2.1.3 Κυτταρικό τοίχωμα	33
2.1.4 Κυτταρική μεμβράνη	35
2.1.5 Χλωροπλάστες	36
2.2 Χρήσιμα συστατικά του μικροφύκου <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	37
2.2.1 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία	37
2.2.2 Λιπίδια	38
2.2.3 Πρωτεΐνες	39
2.2.4 Υδατάνθρακες	39
2.2.5 Φαινολικές ενώσεις	40
2.2.6 Χρωστικές ουσίες	40
2.3 Εφαρμογές και οφέλη των βιοδραστικών συστατικών των μικροφυκών	40
2.3.1 Φαρμακευτική	40
2.3.2 Βιομηχανία τροφίμων και εφαρμογές χρωστικών ουσιών	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης	44
3.1 Εισαγωγή	45
3.2 Είδη εκχύλισης με μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης	45
3.2.1 Κλασσική εκχύλιση	45
3.2.2 Ενζυματική εκχύλιση	47
3.2.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, HPH (High Pressure Homogenization)	49
3.2.4 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, PLE (Pressurized Liquid Extraction)	51
3.2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους	53
3.2.6 Υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO ₂	57
3.2.7 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από τη μέθοδο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά και Μέθοδοι	66
4.1 Εισαγωγή	67
4.2 Παρασκευή αιωρήματος κυττάρων μικροφύκου <i>Chlorella Pyrenoidosa</i> 5% w/w	67
4.3 Επεξεργασία αιωρήματος	68
4.3.1 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης	68
4.3.2 Παλμικά ηλεκτρικά πεδία	69
4.4 Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών της πρώτης ύλης	70
4.5.1 Προσδιορισμός ανακτημένων χλωροφυλλών	72
4.5.2 Προσδιορισμός ανακτημένης λουτεΐνης	72
4.5.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων	73
4.5.4 Προσδιορισμός ξηρού βάρους των εκχυλισμάτων	74

4.6 Μαθηματική μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων	74
4.6.1 Χλωροφύλλες	74
4.6.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	76
4.6.3 Εξίσωση Arrhenius	77
4.6.4 Επιλεκτικότητα της εκχύλισης	77
4.7 Στατιστική επεξεργασία	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αποτελέσματα και σχολιασμός	79
5.1 Εισαγωγή	80
5.2 Προσδιορισμός ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών	80
5.2.2 Μελέτη της κινητικής ανάκτησης των χλωροφυλλών	81
5.2.3 Μέγιστο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών (C_e)	89
5.2.4 Αρχικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών (C_0)	92
5.2.5 Χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης (τ)	94
5.2.6 Επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στον χρόνο t_{95} της εκχύλισης	96
5.2.7 Επίδραση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης στα τελικά ανακτημένα ποσοστά χλωροφυλλών	98
5.2.8 Επίδραση της θερμοκρασίας της εκχύλισης στην ανάκτηση των χλωροφυλλών	100
5.2.9 Ανακεφαλαίωση	104
5.3 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην ανάκτηση της λουτεΐνης.	104
5.3.1 Θερμοκρασία	105
5.3.2 Περιεκτικότητα % v/v σε Αιθανόλη	111
5.3.3 Ανακεφαλαίωση	111
5.4 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην επιλεκτικότητα αυτής	112
5.4.1 Εκλεκτικότητα εκχύλισης ως προς τις χλωροφύλλες	112
5.4.2 Εκλεκτικότητα εκχύλισης της λουτεΐνης ως προς τις χλωροφύλλες	114
5.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων	116
5.5.1 Μοντελοποίηση και μελέτη της χρονικής εξέλιξης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων	116
5.5.2 Μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα ($TEAC_e$)	123
5.5.3 Αρχική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ($TEAC_0$)	126
5.5.4 Χαρακτηριστικός χρόνος εξέλιξης της απελευθέρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών των εκχυλισμάτων (τ_{TEAC})	128
5.5.5 Επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο χρόνο t_{95} , ο οποίος αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.	130

5.5.6 Επίδραση της περιεκτικότητας σε EtOH του διαλύτη της εκχύλισης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.	132
5.5.7 Επίδραση της θερμοκρασίας της εκχύλισης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων	134
5.5.8 Ανακεφαλαίωση	138
5.6 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων.	139
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συμπεράσματα	145
6.1 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών	146
6.2 Επίδραση των συνθηκών πραγματοποίησης της εκχύλισης στην ανακτημένη λουτεΐνη	147
6.3 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην τελική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.	148
6.4 Επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο χρόνο ανάκτησης χλωροφυλλών και εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική ικανότητα	148
6.5 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην εκλεκτικότητα αυτής ως προς τις χλωροφύλλες και τη λουτεΐνη	149
6.6 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος	149
6.7 Προτάσεις για τον βέλτιστο συνδυασμό συνθηκών εκχύλισης και επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία	150
6.8 Προτάσεις για μελλοντική μελέτη	150
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	152

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μικροφύκη

1.1 Εισαγωγή

Τα φύκη είναι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν βλαστούς, φύλλα και ρίζες. Αντί για σπέρματα σχηματίζουν σπόρια, δεν έχουν άνθη και καρπούς, όπως τα ανώτερα φυτά και παρουσιάζουν πολύ απλή οργάνωση. Από πλευράς μορφολογίας ποικίλλουν εξαιρετικά. Απαντώνται τόσο μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς όσο και πολύπλοκες διακλαδισμένες. Η ικανότητα των ανθρώπων να τα διακρίνουν με γυμνό μάτι ή όχι τα κατατάσσει σε δύο μεγάλες βασικές κατηγορίες. Τα μικροφύκη και τα μακροφύκη. Στα τελευταία, ο θαλλός, η όλη, δηλαδή, δομή, με άλλα λόγια το σώμα του εκάστοτε φύκους φτάνει σε πολλές περιπτώσεις από 50 έως 70 μέτρα, αναπτύσσοντας την κατηγορία των Φαιοφυκών τα οποία είναι γιγάντια. Άλλες κατηγορίες μακροφυκών είναι τα Ροδοφύκη και τα Χλωροφύκη. Αυτά βρίσκονται κατά κύριο λόγο στους ωκεανούς, όπου εκεί όλος ο θαλλός συμμετέχει στη φωτοσύνθεση, βρίσκοντας τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται μέσα στο νερό.

Τα μικροφύκη είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανισμών είτε προκαρυωτικοί είτε ευκαρυωτικοί. Τα περισσότερα είναι ευκαρυωτικά και ο πυρήνας τους μοιάζει με των ανώτερων φυτών, ενώ στα οργανιδιά τους υπάρχει ο χλωροπλάστης, όπου γίνεται η φωτοσύνθεση. Από τα 50.000 είδη περίπου που υπάρχουν σε υδατικό και χερσαίο περιβάλλον, έχουν ταυτοποιηθεί μόνο τα 4.000. Η βασική τους κατηγοριοποίηση γίνεται με κριτήριο την παρουσία διακριτού πυρήνα, το είδος των φωτοσυνθετικών χρωστικών, τον τύπο μεταβολισμού, τη χημική σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης, την ύπαρξη μαστιγίων και τον τρόπο αναπαραγωγής. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ μερικών μικρομέτρων. Οι κύριες κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα Διάτομα, τα Πυρροφύκη ή Δινοφύκη, τα Χλωροφύκη, τα Ροδοφύκη και μερικές λιγότερο γνωστές ομάδες. Εκτός από ευκαρυωτικά, όμως, συναντώνται και προκαρυωτικά μικροφύκη με κύρια τα Κυανοβακτήρια ή Κυανοφύκη, με πιο γνωστά αυτά που βρίσκουν εφαρμογή στην διατροφή και την κοσμετολογία, όπως είναι τα γένη κυανοβακτηρίων, *Spirulina sp.* και *Nostoc sp.*

Το βασικό ενδιαίτημα των φυκών είναι τα υδάτινα συστήματα κάθε είδους, όπως λίμνες, ποτάμια, και ωκεανοί. Άλλα αναπτύσσονται σε βράχους, πέτρες, ξύλα τόσο σε ήπιες όσο και σε ακραίες θερμοκρασίες.

Τα μικροφύκη είναι αυτότροφοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, όπως τα ανώτερα φυτά, άρα σε ένα οικοσύστημα έχουν ίδιο ρόλο με αυτά, καθώς και εκείνα δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια για να πραγματοποιήσουν την διεργασία της φωτοσύνθεσης. Κύρια φωτοσυνθετική

χρωστική τους είναι η χλωροφύλλη α. Είναι παραγωγοί οργανισμοί και εμπλουτίζουν το νερό με οξυγόνο. Βέβαια, υπάρχουν και περιπτώσεις, όπου γίνεται χρήση τόσο οργανικού όσο και ανόργανου άνθρακα ως πηγή θρεπτικού υλικού για αυτά, άρα πολλά μικροφύκη είναι και ετερότροφοι, αλλά και μιξότροφοι οργανισμοί. Είχαν και έχουν επίδραση στην εξέλιξη της ζωής και στην διαμόρφωση του κλίματος. Για παράδειγμα τα Κυανοφύκη ήταν από τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που συνετέλεσαν στην ενίσχυση της ατμόσφαιρας της Γης με οξυγόνο. Στην θάλασσα με κύριο εκπρόσωπο το φυτοπλαγκτόν, τα μικροφύκη αποτελούν την βάση της τροφικής αλυσίδας.

Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που έχουν τα μικροφύκη στα οικοσυστήματα που ευδοκούν, βρίσκουν εφαρμογή και σε πολλούς τομείς, όπως:

- Στη διατροφή, καθώς πολλά είδη φυκών είναι απολύτως βρώσιμα, παρέχοντας πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, λιπίδια και αντιοξειδωτικές και χρωστικές ουσίες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν συμπληρώματα διατροφής, πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά.
- Χρωστικές ουσίες οι οποίες απομονώνονται από τα φύκη με χρήση αυτών ως αντιοξειδωτικά συστατικά στη βιομηχανία χρωμάτων, σε καλλυντικά κα. Είναι πλούσια σε ιχνοστοιχεία και αμινοξέα με σημαντικές καλλυντικές ιδιότητες και θεραπευτικές δράσεις ενυδάτωσης.
- Χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής οικόσιτων ζώων.
- Στην γεωργία, εφόσον συστατικά από μικροφύκη βρίσκουν εφαρμογή σε λιπάσματα. Παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε αυξητικές ορμόνες. Βοηθούν στην ανάπτυξη φυτών και στην ενισχυμένη προστασία τους κατά των διαφόρων μικροβίων και ασθενειών.
- Κάποια είδη μικροφυκών έχουν δυνατότητα να απορροφούν θρεπτικά συστατικά και βαρέα μέταλλα, τα οποία βρίσκονται σε απόβλητα βιολογικών καθαρισμών. Έτσι ορισμένα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σαν βιοφίλτρα, για τον καθαρισμό υγρών αποβλήτων.
- Αποτελούν βιοδείκτες, καθώς ορισμένα φύκη καθορίζουν την ποιότητα του νερού. Ως μικροοργανισμοί, προκειμένου να πολλαπλασιαστούν, καταναλώνουν διοξείδιο του άνθρακα, άζωτο και φώσφορο τα οποία περιέχουν σε υψηλές τιμές τα αστικά λύματα και έτσι τα καθαρίζουν. Γίνεται χρήση μικροφυκών που αναπτύσσονται τόσο

σε μολυσμένα περιβάλλοντα, όσο και σε καθαρά νερά, και με αυτόν τον τρόπο, γίνεται διάκριση του νερό, ως ποιοτικό ή μη (ΕΛ.Φ.Ε 2008)



Εικόνα 1.1 Επισκόπηση κύριων βιοτεχνολογικών εφαρμογών μικροφυκών (Vale et al. 2020)

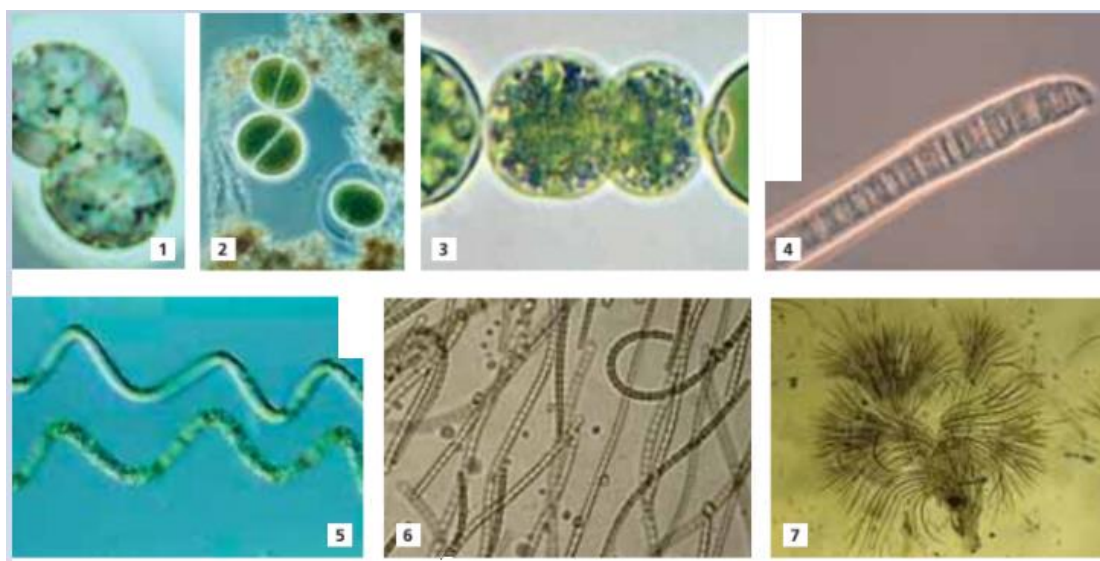
1.2 Ταξινόμηση μικροφυκών

Τα μικροφύκη, στην κατηγορία των οποίων ανήκει και το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, το οποίο μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες.

1.2.1 Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria, Cyanophyceae, Blue green algae)

Τα κυανοφύκη ή κυανοβακτήρια είναι μικροφύκη, τα οποία ανήκουν στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και δεν φέρουν σχηματισμένους πυρήνες, χλωροπλάστες ή τα άλλα οργανίδια που διαθέτει ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Ωστόσο, φωτοσυνθέτουν. Το χρώμα τους είναι κυανοπράσινο, καθώς στο κύτταρό τους είναι κυρίαρχη η χρωστική πρωτεΐνη φυκοκυανίνη.

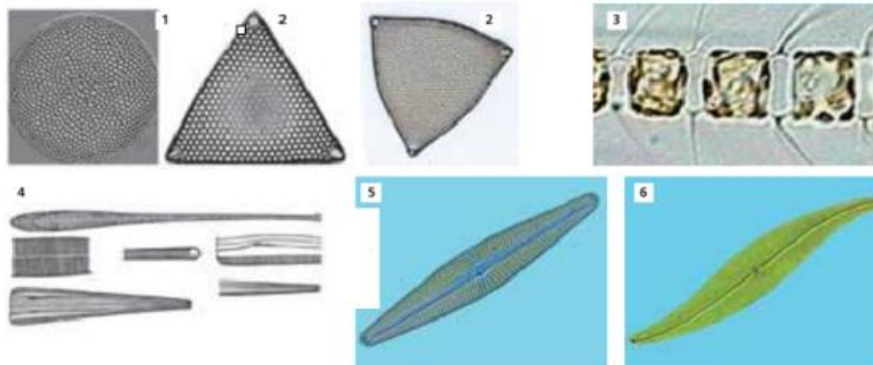
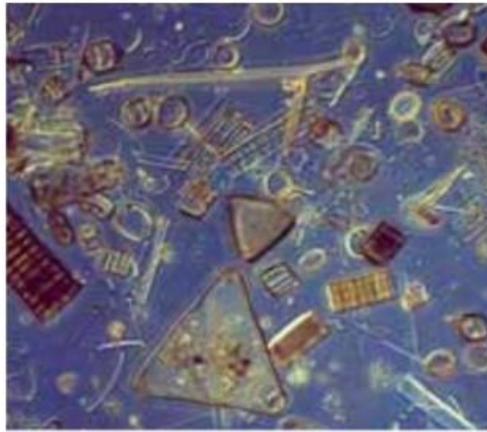
Συναντώνται σε μονοκύτταρες μορφές, νηματοειδείς και σχηματίζουν αποικίες. Είναι είτε ακίνητα είτε κινούνται και αναπαράγονται είτε αγενώς είτε με κυτταρική διαίρεση, είτε με σχηματισμό ειδικών κυττάρων. Αποτελούν έναν από τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που αναπτύχθηκαν στη Γη, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της γήινης ατμόσφαιρας με οξυγόνο. Εκτός από αυτότροφοι παραγωγοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να ενισχύουν το περιβάλλον στο οποίο ζουν με αυτό. Περιλαμβάνουν περίπου 2.000 είδη. Ενδεικτικά ορισμένα από τα γένη αυτών είναι : *Rivularia sp.* , *Chroococcus sp.* , *Cyanothece sp.* , *Synechococcus sp.* , *Oscillatoria sp.* , *Spirulina sp.* , *Anabaena sp.* , *Nostoc sp.* (ΕΛ.Φ.Ε 2008).



Εικόνα 1.2 Κυανοφύκη όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο (ΕΛ.Φ.Ε 2008).

1.2.2 Διάτομα (*Bacillariophyceae* ή *Diatomeae*)

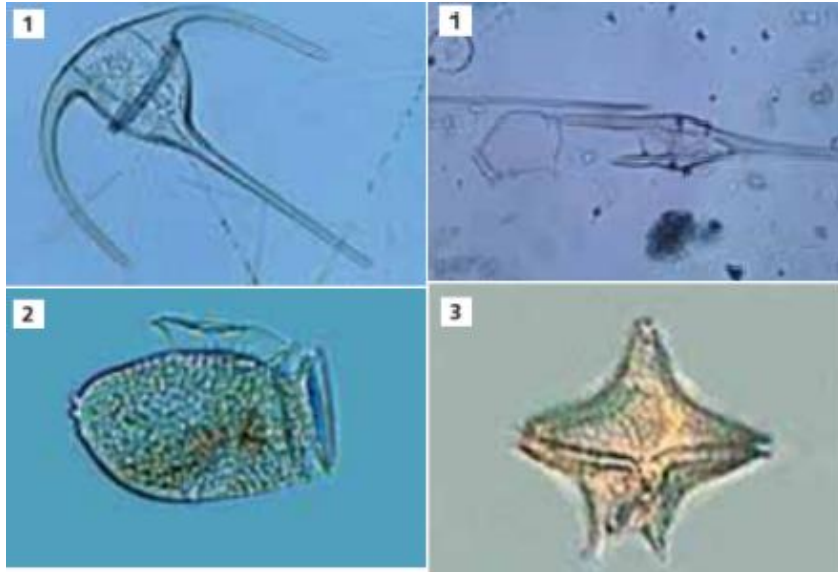
Πρόκειται για ευκαρυωτικούς, μονοκύτταρους μικροοργανισμούς που σχηματίζουν αποικίες. Διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα πυριτίου, τη λεγόμενη «θήκη» με ανάγλυφες μορφές. Η «θήκη» αυτή των διατόμων αποτελείται από δύο ίσα τμήματα, τις θυρίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας την παραπάνω δομή . Χαρακτηρίζονται από συμμετρία. Περιλαμβάνουν περίπου 16.000 είδη. Ορισμένα γένη τους είναι : *Coscinodiscus sp.* , *Triceratium sp.* , *Chaetoceros sp.* , *Achnanthes sp.* , *Licmophora sp.* , *Navicula sp.* , *Nitzschia sp.* , *Pleurosigma sp.* (ΕΛ.Φ.Ε 2008).



Εικόνα 1.3 Διάτομα στο μικροσκόπιο (ΕΛ.Φ.Ε 2008)

1.2.3 Δινοφύκη, δινομαστιγωτά, πυρροφύκη (Dinophyceae, Dinoflagellates)

Πρόκειται για μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι μετακινούνται με τη βοήθεια μαστιγίων. Το κύτταρό τους περικλείεται από μία θήκη κυτταρίνης, η οποία σχηματίζεται από σκληρές πλάκες πολυμερούς. Περιλαμβάνουν περίπου 800 είδη. Τα περισσότερα είναι θαλάσσια, ενώ ορισμένα ζουν και σε γλυκά νερά. Συνήθη γένη τους είναι: *Ceratium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum*.

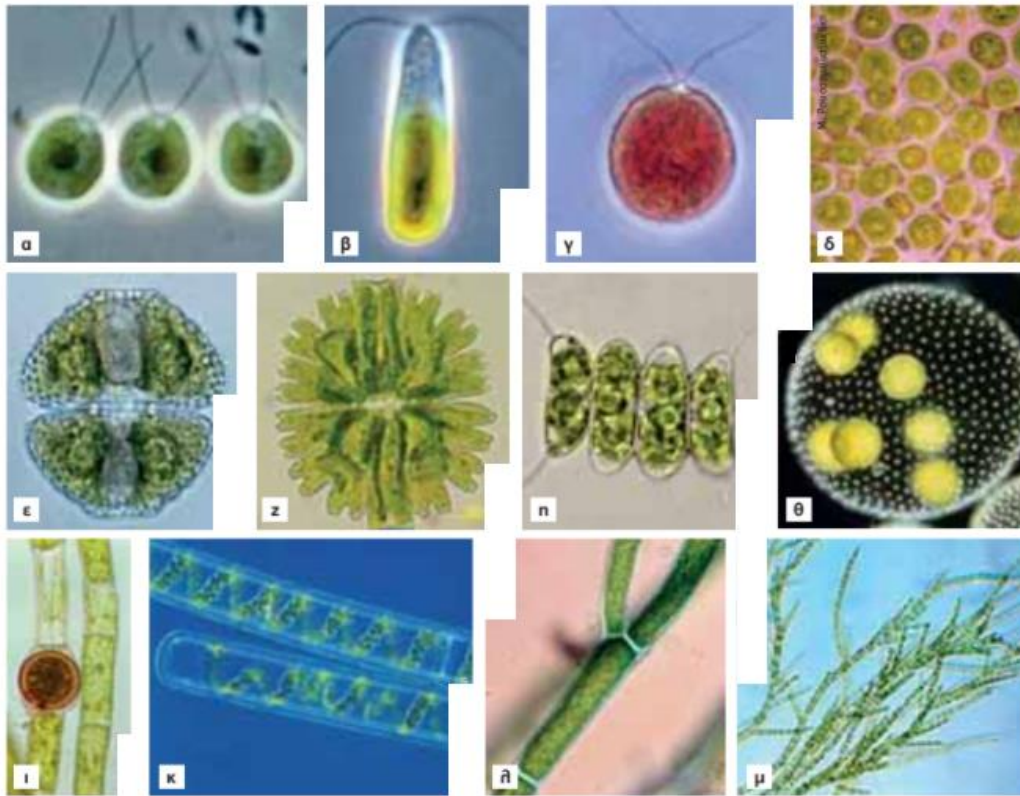


Εικόνα 1.4 Δινοφύκη (ΕΛ.Φ.Ε 2008).

1.2.4 Χλωροφύκη (Chlorophyta, Chlorophyceae, Green algae)

Τα χλωροφύκη είναι μια μεγάλη ομάδα με περισσότερα από 400 γένη και 6.000 είδη. Διακρίνονται σε πολυκύτταρα και μονοκύτταρα. Τα κύτταρά τους είναι ευκαρυωτικά, φέρουν σχηματοποιημένο πυρήνα, έναν ή περισσότερους χλωροπλάστες και πυρηνοειδή. Υπάρχουν πολλοί τύποι τόσο κινητοί με ένα ή περισσότερα μαστίγια, όσο και ακίνητοι, μικρού μεγέθους ή ορατοί με γυμνό μάτι, αποικιακοί, νηματοειδείς, διακλαδιζόμενοι ή μη. Το χρώμα τους είναι κυρίως πράσινο λόγω της κυριαρχίας της χλωροφύλλης α. Έχουν όμως και άλλες χρωστικές όπως είναι η χλωροφύλλη α και β, καροτένιο και ξανθοφύλλες με κύρια τη λουτεΐνη. Αναπαράγονται με αγενή ή και εγγενή τρόπο και είναι παραγωγοί αυτότροφοι οργανισμοί. Χαρακτηριστικά μονοκύτταρα ή αποικιακά Χλωροφύκη είναι τα α) κινητά : *Chlamydomonas sp.* , *Dunaliella sp.*, *Volvox sp.* και τα β) ακίνητα : *Chlorella sp.* , *Cosmarium sp.* , *Micrasterias sp.* , *Scenedesmus sp.* . Νηματοειδή με μεγαλύτερες διαστάσεις, που ευδοκούν κυρίως σε γλυκά νερά είναι τα α) διακλαδιζόμενα: *Spirogyra sp.*, *Oedogonium sp.*

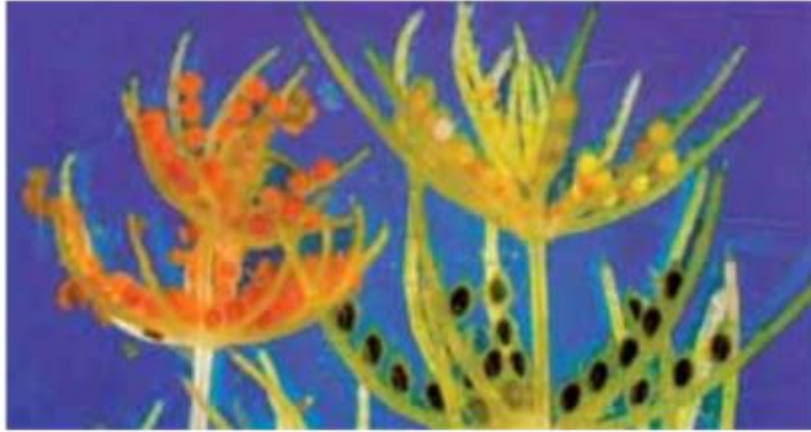
και β) μη διακλασμένα *Stigeoclonium* sp. , *Chladophora* sp.



Εικόνα 1.5 Χλωροφύκη στο μικροσκόπιο (ΕΛ.Φ.Ε 2008).

1.2.5 Χαροφύκη (Charophyta)

Τα Χαροφύκη μοιάζουν βιοχημικά με τα χλωροφύκη όμως διαφέρουν μορφολογικά. Ανήκουν στην κατηγορία των μακροφυκών. Σχηματίζουν νήματα του ενός μέτρου, τα οποία στερεώνονται με ριζοειδή. Έχουν γόνατα με ακτινωτούς πλευρικούς κλάδους με περιορισμένη ανάπτυξη. Κατά την αναπαραγωγή τους σχηματίζονται αρσενικά ανθηρίδια και θηλυκά ωγόνια. Τα γνωστότερα είναι τα γένη *Chara* sp. και *Nitella* sp. Αναπτύσσονται σε καθαρά ρηχά νερά, σε λίμνες και ρυάκια.



Εικόνα 1.6 Χαροφύκος όπως φαίνεται στο στερεοσκόπιο (ΕΛ.Φ.Ε 2008).

1.2.6 Ροδοφύκη (Rhodophyta, Rhodophyceae, Red algae)

Τα ροδοφύκη είναι κυρίως θαλάσσια φύκη, χωρίς όμως να εξαιρούνται και περιπτώσεις που ζουν και σε γλυκά νερά. Η πλειονότητα αυτών είναι πολυκύτταρα με πολύπλοκη δομή, ωστόσο υπάρχουν και μονοκύτταρα. Εκτός από την χλωροφύλλη α έχουν και φυκοερυθρίνη και φυκοκυανίνη που απορροφούν στο πράσινο και στο μπλε φως. Η φυκοερυθρίνη ευθύνεται για το ρόδινο χρώμα τους. Αυτές οι φωτοσυνθετικές χρωστικές που περιέχουν τους δίνουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται και σε βάθος ως 200 μέτρα.

Το κύριο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα ροδοφύκη είναι ότι από αυτά λαμβάνονται καραγενάνες, που βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και το άγαρ, γνωστό για τη χρήση του ως θρεπτικό υπόστρωμα σε μικροβιακές καλλιέργειες. Σήμερα είναι γνωστά περίπου 4000 είδη ροδοφυκών (ΕΛ.Φ.Ε 2008).

Στον παρακάτω **Πίνακα 1.1**, παρουσιάζονται συνοπτικά όλα τα είδη των φυκών.

Πίνακας 1.1 Γένη, τάξεις και είδη φυκών, καθώς και ταξινόμηση αυτών σε μικρό και μακρό-φύκη (Enamala et al. 2018).

<i>Γένος</i>	<i>Μακροφύκη</i>	<i>Μικροφύκη</i>	<i>Τάξη</i>	<i>Είδος</i>
<i>Ροδοφύκη</i>	+	+	8	7250
<i>Χλωροφύκη</i>	+	+	12	6626
<i>Χαροφύκη</i>	+	–	6	4782
<i>Δινοφύκη</i>	–	+	5	3560
<i>Απτοφύκη</i>	–	+	3	759
<i>Ευγλενοφύκη</i>	–	+	8	1493
<i>Γλαυκοφύκη</i>	–	+	1	25
<i>Κρυπτοφύκη</i>	–	+	2	219
<i>Οχροφύκη</i>	+	+	16	4140
<i>Κυανοφύκη</i>	–	+	1	4663
<i>Ολικά</i>			67	33511

1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών

Η κυτταρική ανάπτυξη των μικροφυκών εμφανίζει πέντε φάσεις:

- Λανθάνουσα φάση
- Εκθετική φάση
- Στατική φάση
- Φάση θανάτου

Κατά τη λανθάνουσα φάση παρατηρείται αύξηση των κυττάρων. Ο ρυθμός της λανθάνουσας φάσης καθορίζεται από την προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στις συνθήκες ανάπτυξης, όπως είναι η αύξηση των ενζύμων και μεταβολιτών που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση και στην δέσμευση του άνθρακα.

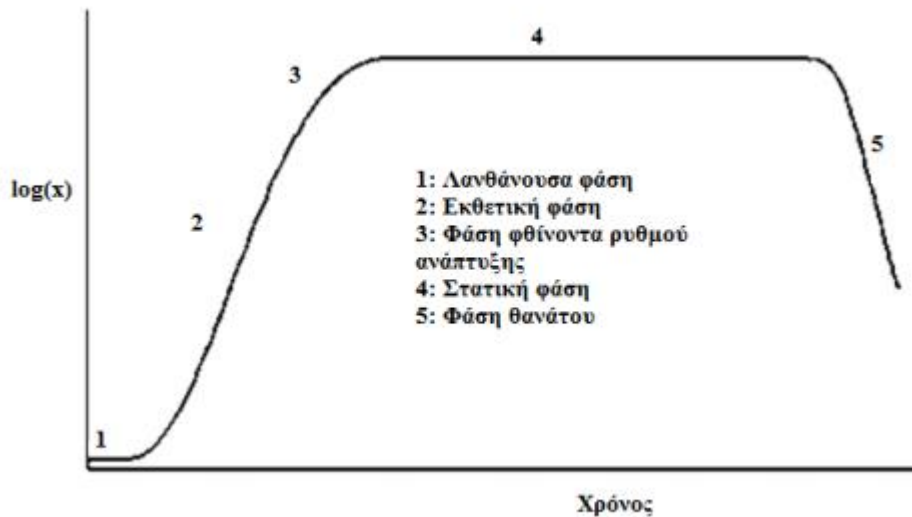
Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης, τα κύτταρα αυξάνονται εκθετικά με τον χρόνο βάσει της εξίσωσης $C_t = C_0 \cdot e^{mt}$, όπου C_t και C_0 οι συγκεντρώσεις των κυττάρων σε χρόνο t και 0 αντίστοιχα, και m ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Ο ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας διαφέρει ανάλογα με το είδος των φυκών και εξαρτάται επίσης από την ένταση του φωτός και την θερμοκρασία.

Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, το φως, το CO_2 , το pH καθώς και άλλοι χημικοί παράγοντες μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και φθίνουν τον ρυθμό της ανάπτυξης, δρώντας σαν περιοριστικοί παράγοντες.

Στη στατική φάση, ο ρυθμός ανάπτυξης και ο ρυθμός δράσης του περιοριστικού παράγοντα εξισώνονται με αποτέλεσμα να παρατηρείται σταθερή συγκέντρωση κυττάρων.

Τέλος, κατά την φάση θανάτου, η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται, τα θρεπτικά συστατικά μειώνονται και δεν ευνοείται πια η ανάπτυξη των κυττάρων. Η πυκνότητα τους μειώνεται πολύ γρήγορα και η καλλιέργεια καταρρέει.

Μια καλλιέργεια μπορεί να αλλοιωθεί από έλλειψη ενός συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού, από αυξημένη θερμοκρασία, από απότομη αλλαγή του pH ή από μόλυνση της καλλιέργειας. Η συνεχής παραγωγή βιομάζας μικροφυκών επιτυγχάνεται με την διατήρηση τους στην εκθετική φάση. Επιπλέον, η θρεπτική αξία της βιομάζας που παράγεται στο τρίτο στάδιο είναι υψηλότερη από αυτήν που παράγεται στα επόμενα, λόγω μειωμένης ευπεψίας ή πιθανής παραγωγής τοξικών μεταβολιτών (Βάσσου Μιχάλης 2017)



Διάγραμμα 1.1 Διάγραμμα φάσεων του κύκλου ζωής των μικροφυκών (Βάσσου Μιχάλης 2017)

1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών πραγματοποιείται είτε σε ανοικτούς είτε σε κλειστούς τύπους καλλιεργειών, των οποίων η επιλογή γίνεται ανάλογα με τους στόχους και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες είναι τεχνητοί ή φυσικοί περιέκτες, όπως δεξαμενές και λίμνες, ενώ οι κλειστού τύπου γίνονται μέσα σε φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors) υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η άμεση επαφή των καλλιεργειών με το εξωτερικό περιβάλλον και επιτυγχάνεται η προστασία τους. Οι τύποι καλλιέργειας μικροφυκών αντικατοπτρίζουν την ποικιλότητα της φυσιολογίας και των απαιτήσεων των διαφόρων ειδών. Ο βασικός στόχος κάθε καλλιέργειας είναι η συνεχής συντήρηση αυτής σε συνθήκες, στις οποίες επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση και παραγωγικότητα (Molina et al. 2001).

1.4.1 Ανοιχτού τύπου καλλιέργειες

Η καλλιέργεια για εμπορική παραγωγή μικροφυκών πραγματοποιείται σε ανοικτούς χώρους, οι οποίοι αποτελούν το πιο διαδεδομένο σύστημα για την ανάπτυξη μικροφυκών. Οι

καλλιέργειες ανοικτού τύπου είναι είτε φυσικές λίμνες, είτε κυκλικές ή επιμήκειες λεκάνες (raceways). Βασικός περιορισμός αυτού του είδους καλλιέργειας είναι η πιθανή μόλυνση και οι επιμέρους δυσκολίες σταθεροποίησης και ελέγχου των συνθηκών της καλλιέργειας. Άλλοι μικροοργανισμοί, πιθανώς άλλα είδη μικροφυκών ή και βακτήρια αλλοιώνουν την σύσταση και μειώνουν την απόδοση της καλλιέργειας. Προκειμένου να διατηρηθεί ένα ανοικτό σύστημα, επιλέγονται είδη μικροφυκών που παρουσιάζουν υψηλή παραγωγικότητα σε ειδικές συνθήκες ανάπτυξης. Έτσι, με τις κατάλληλες συνθήκες επιτυγχάνεται η ανάπτυξη του επιθυμητού είδους. Ωστόσο οι καλλιέργειες σε ανοιχτό περιβάλλον είναι επιρρεπείς στις αλλαγές της θερμοκρασίας και στην ηλιακή ακτινοβολία, δυσχεραίνοντας έτσι τον έλεγχο των συνθηκών που είναι επιθυμητές για τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας μικροφυκών. Επίσης, η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις καλλιέργειες κλειστού τύπου με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος συγκομιδής.

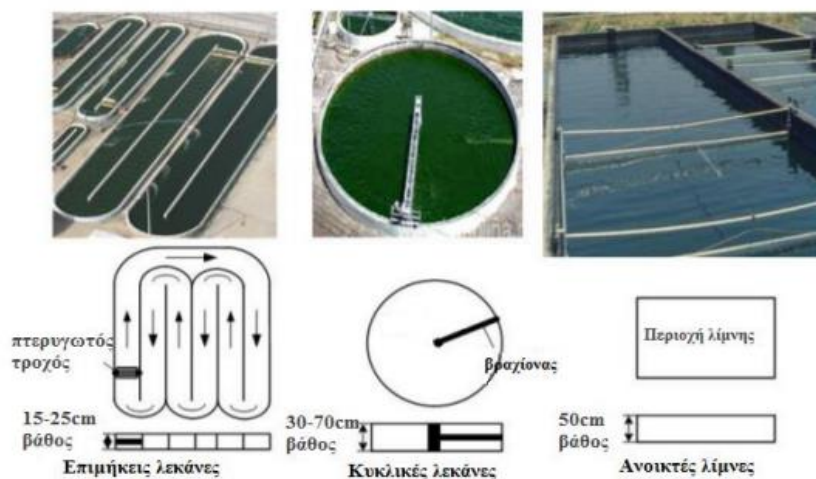
Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες ευνοούνται μέσω της προσθήκης θρεπτικών συστατικών. Αν και αυξάνεται με αυτόν τον τρόπο το κόστος, διασφαλίζεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Τα πιο διαδεδομένα ανοικτά συστήματα για την εμπορική παραγωγή βιομάζας μικροφυκών είναι οι επιμήκειες λεκάνες. Έχουν ωοειδές σχήμα, αποτελούνται από έναν ή πολλαπλούς βρόγχους, με βάθος 15-20 cm και αναδεύονται με την χρήση ενός πτερυγωτού τροχού. Προκειμένου να ελεγχθεί η ροή και να επιτευχθεί η καλή ανάμειξη στις στροφές της λεκάνης τοποθετούνται διαφράγματα. Κατασκευάζονται από τσιμέντο και επικαλύπτονται από στρώμα πλαστικού υλικού. Κατά την λειτουργία μιας λεκάνης, το θρεπτικό μέσο προστίθεται μπροστά από τον πτερυγωτό τροχό ενώ η συγκομιδή πραγματοποιείται πίσω από τον τροχό.

Το απαιτούμενο CO₂ για την ανάπτυξη των μικροφυκών λαμβάνεται μέσω της φυσικής επαφής της καλλιέργειας με τον περιβάλλοντα αέρα. Σε κάποιες περιπτώσεις, τοποθετούνται βυθισμένοι ανεμιστήρες, προκειμένου να αυξήσουν την απορρόφηση CO₂. Το απαραίτητο φως για την ανάπτυξη των μικροφυκών προέρχεται από το φυσικό φως του ήλιου. Οι λεκάνες μπορούν να καλυφθούν από σκέπαστρα ώστε να ελέγχεται καλύτερα η θερμοκρασία της καλλιέργειας.

Οι επιμήκειες λεκάνες παρουσιάζουν σχετικά χαμηλό πάγιο κόστος και λειτουργικά έξοδα. Τα βασικά έξοδα μιας τέτοιας εγκατάστασης περιλαμβάνουν το κόστος του μέσου ανάπτυξης της καλλιέργειας και της εγκατάστασής της. Η ανάδευση στις καλλιέργειες ανοικτού τύπου αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την λειτουργία μιας εγκατάστασης παραγωγής

βιομάζας μικροφυκών. Είναι απαραίτητη γιατί ομογενοποιεί το υπόστρωμα ανάπτυξης βελτιώνοντας την πρόσληψη των ανόργανων στοιχείων από τα μικροφύκη, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός και του CO₂ και εμποδίζει την καθίζηση και συσσωμάτωση των μικροφυκών ενέργειας που απαιτείται για την ανάδευση (Chorin and Sawhney 2009).



Εικόνα 1.7 Επιμήκειες, κυκλικές και ανοικτές λεκάνες για καλλιέργεια μικροφυκών (Chorin and Sawhney 2009).

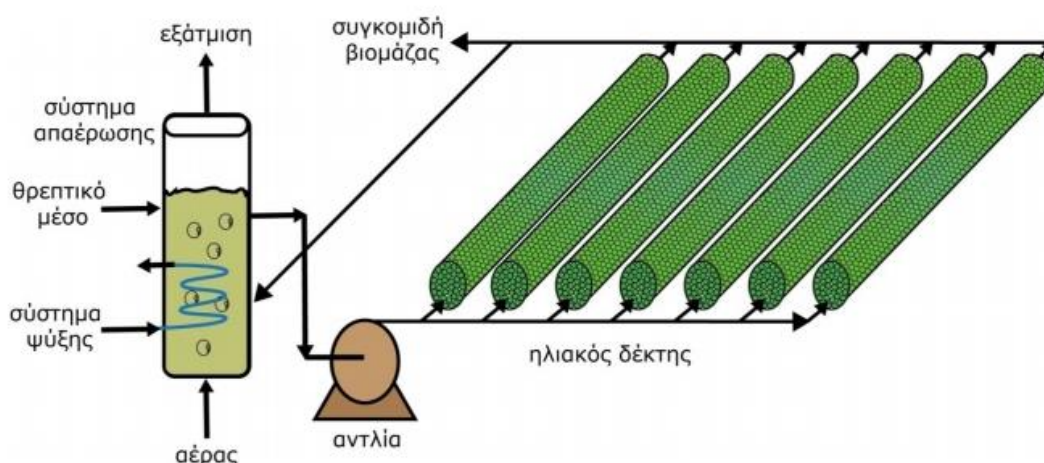
1.4.2 Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Σε μια κλειστού τύπου καλλιέργεια υπάρχει δυνατότητα καλλιέργειας φυκών παρατεταμένης διάρκειας. Στις καλλιέργειες αυτού του τύπου που ονομάζονται συνεχείς καλλιέργειες, η προγραμματισμένη σταδιακή αφαίρεση όγκου καλλιέργειας και η ταυτόχρονη προσθήκη ισόποσου όγκου θρεπτικού μέσου εξασφαλίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και μεγαλύτερο βαθμό ασφάλειας σε ποιοτικά μεγέθη των προϊόντων της καλλιέργειας. Συστήματα συνεχούς καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για παραγωγή βιομάζας που προορίζεται για χρήση στη φαρμακοβιομηχανία, για μετάβαση από μικρότερου σε μεγαλύτερου όγκου εμπορικές καλλιέργειες (scale-up) και σε μικρής-μεσαίας κλίμακας εμπορικές καλλιέργειες.

Η καλλιέργεια ενός φύκου μπορεί να γίνει σε σταθερό όγκο θρεπτικού μέσου χωρίς καμία επέμβαση μέχρι την ολοκλήρωσή της. Ο συγκεκριμένος τύπος καλλιεργειών είναι γνωστός ως στατικές καλλιέργειες ή καλλιέργειες δέσμης (batch cultures) και χρησιμοποιείται κυρίως

για τη συντήρηση αποθέματος καλλιέργειών, την απομόνωση στελεχών και τη δημιουργία νέων καλλιέργειών και τη διερεύνηση του ρυθμού αύξησης ή των αναπτυξιακών φάσεων ενός φύκου. Οι στατικές καλλιέργειες μπορεί να γίνουν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τριβλία Petri, κωνικές φιάλες ή ακόμη και σε διαφανείς σάκους πολυαιθυλενίου. Στις στατικές καλλιέργειες, η μοναδική επέμβαση είναι η περιοδική ή συνεχής ανάμειξη του θρεπτικού μέσου, που επιτυγχάνεται είτε με μηχανική ανάδευση ολόκληρου του δοχείου της καλλιέργειας είτε με την παροχή αέρα (απαλλαγμένου από σωματίδια και μικροοργανισμούς) στη βάση των δοχείων καλλιέργειας.

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται επίσης και σε κλειστούς περιέκτες που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες. Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων μπορεί να ποικίλλουν. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι, σαν ηλιακοί συλλέκτες, κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί ή ελικοειδούς μορφής με επιμήκεις αγωγούς, κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό). Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων για τον επιτυχή σχεδιασμό των διαφόρων υποσυστημάτων που τον απαρτίζουν. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO₂, 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνσης O₂ και διαχωρισμού αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα θρέψης (Chopin and Sawhney 2009).



Εικόνα 1.8 Απεικόνιση συστήματος φωτοβιοαντιδραστήρα για καλλιέργεια και συγκομιδή βιομάζας μικροφυκών (Molina et al. 2001).

Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές, οι καλλιέργειες αυτού του τύπου έχουν αυξημένο κόστος κατασκευής και λειτουργίας και επίσης περιορισμένη δυνατότητα να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις. Ένας βασικός περιοριστικός παράγοντας για μεγάλης κλίμακας φωτοβιοαντιδραστήρων είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό θρεπτικό μέσο. Το μοριακό οξυγόνο που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση, λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα, διαλύεται στο θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια θα πρέπει να απομακρυνθεί λόγω του ότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αυτό το γεγονός περιορίζει αρκετά το μήκος των αγωγών (Brennan and Owende 2010).

Πίνακας 1.2 Σύγκριση ανοιχτών και κλειστών καλλιέργειών μικροφυκών (Brennan and Owende 2010).

Χαρακτηριστικό	Ανοιχτά συστήματα	Κλειστά συστήματα
Κίνδυνος μόλυνσεων	Πολύ υψηλός	Χαμηλός
Απαιτούμενος χώρος	Μεγάλος	Μικρός
Απώλεια νερού (π.χ. εξάτμιση)	Πολύ υψηλή	Δεν υπάρχει
Απώλεια CO ₂	Υψηλή	Δεν υπάρχει
Καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών	Λίγα είδη	Σχεδόν όλα τα είδη μπορούν να καλλιεργηθούν
Έλεγχος συνθηκών ανάπτυξης καλλιέργειας	Δεν υπάρχει	Υπάρχει
Επίδραση καιρικών συνθηκών	Σημαντική, η παραγωγή είναι αδύνατη κατά τη διάρκεια ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων	Μη σημαντική
Λανθάνουσα φάση της καλλιέργειας	Μεγάλη, περίπου 6-8 εβδομάδες	Σχετικά μικρή, περίπου 2-4 εβδομάδες
Συγκέντρωση βιομάζας κατά την περίοδο της παραγωγής	Χαμηλή, περίπου 0.1-0.2 gL ⁻¹	Υψηλή, περίπου 2-8 gL ⁻¹

1.4.3 Φωτοτροφική καλλιέργεια

Η φωτοτροφική καλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα μικροφύκη χρησιμοποιούν φως, όπως το ηλιακό, ως πηγή ενέργειας, και ανόργανο άνθρακα, όπως το CO₂, ως πηγή άνθρακα για να σχηματίσουν χημική ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης. Αυτή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος καλλιέργειας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της φωτοτροφικής καλλιέργειας μικροφυκών είναι η κατανάλωση CO₂ ως πηγή άνθρακα για την κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή λιπαρών. Παρ' όλα αυτά, όταν χρησιμοποιείται το CO₂ ως μοναδική πηγή άνθρακα, η μονάδα καλλιέργειας μικροφυκών

πρέπει να βρίσκεται κοντά σε εργοστάσια ή σταθμούς παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας για να είναι εφικτή η παροχή μεγάλων ποσοτήτων CO₂ για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Επιπλέον, εάν συγκρίνουμε με άλλου τύπου καλλιέργειες μικροφυκών, η πιθανότητα μόλυνσης στην αυτότροφη ανάπτυξη είναι σχετικά μικρή. Επομένως, τα υπαίθρια συστήματα καλλιέργειας των μικροφυκών μεγάλης κλίμακας, όπως για παράδειγμα οι επιμήκεις λεκάνες, χρησιμοποιούνται συνήθως υπό συνθήκες φωτοτροφικής καλλιέργειας (Liang, Sarkany, and Cui 2009).

1.4.4 Ετερότροφη καλλιέργεια

Ορισμένα είδη μικροφυκών μπορούν να αναπτυχθούν είτε φωτοτροφικά, είτε μέσω της χρήσης οργανικού άνθρακα σε συνθήκες σκότους, όπως ακριβώς συμβαίνει με τα βακτήρια. Η κατάσταση στην οποία τα μικροφύκη χρησιμοποιούν οργανικό άνθρακα, τόσο για ενέργεια όσο και για πηγή άνθρακα, ονομάζεται ετερότροφη καλλιέργεια. Το είδος αυτό της καλλιέργειας θα μπορούσε να ξεπεράσει τα διάφορα προβλήματα τα οποία σχετίζονται με το φωτισμό των μικροφυκών, όπως π.χ. η δυσκολία σχηματισμού υψηλής πυκνότητας κυττάρων σε μεγάλης κλίμακας φωτοβιοαντιδραστήρες. Με τέτοιου είδους καλλιέργεια επιτυγχάνεται μεγαλύτερη παραγωγή της βιομάζας. Επιπλέον, κάποια είδη μικροφυκών παρουσιάζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπαρά κατά τη διάρκεια της ετερότροφης ανάπτυξης τους. Για παράδειγμα, η *Chlorella pyrenoidosa* αύξησε το περιεχόμενο της σε λιπαρά κατά 40% με την αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας από φωτοτροφικές σε ετερότροφες συνθήκες. Τα μικροφύκη μπορούν να αφομοιώσουν μια ποικιλία οργανικών πηγών άνθρακα για την ανάπτυξή τους, όπως είναι η γλυκόζη, τα οξικά άλατα, η γλυκερόλη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, η λακτόζη, η γαλακτόζη και η μαννόζη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι οικονομικές οργανικές πηγές άνθρακα για την αύξηση της παραγωγής βιομάζας. Παρ' όλα αυτά, το ετεροτροφικό σύστημα το οποίο στηρίζεται στην παροχή σακχάρων συχνά αντιμετωπίζει προβλήματα μόλυνσης (Xiong et al. 2008).

1.4.5 Μιξότροφη καλλιέργεια

Η καλλιέργεια ονομάζεται μιξότροφη, όταν τα μικροφύκη υποβάλλονται σε φωτοσύνθεση με ταυτόχρονη χρήση οργανικών ουσιών και ανόργανου άνθρακα (CO₂), ως πηγή για την ανάπτυξή τους. Αυτό σημαίνει ότι τα μικροφύκη μπορούν να ζουν κάτω από συνθήκες είτε φωτοτροφικές, είτε ετερότροφες, είτε σε συνδυασμό. Συνεπώς τα κύτταρα αφομοιώνουν τις οργανικές ουσίες και το CO₂ ως πηγή άνθρακα, και το CO₂ το οποίο απελευθερώνεται μέσω της αναπνοής, μπορεί να παγιδευτεί και να επαναχρησιμοποιηθεί στα πλαίσια φωτοτροφικής καλλιέργειας. Συγκρινόμενη με τη φωτοτροφική και την ετερότροφη καλλιέργεια, η μιξότροφη χρησιμοποιείται σπάνια και μόνο για ερευνητικούς σκοπούς για την παραγωγή λιπαρών από τα μικροφύκη και επομένως για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Liang, Sarkany, and Cui 2009).

1.4.6 Φωτοετερότροφη καλλιέργεια

Η φωτοετερότροφη καλλιέργεια λαμβάνει χώρα όταν τα μικροφύκη απαιτούν φως για τη χρησιμοποίηση οργανικών ουσιών ως πηγή άνθρακα. Η βασική διαφορά μεταξύ μιξότροφων και φωτοετερότροφων καλλιεργειών, είναι ότι οι τελευταίες απαιτούν φως ως πηγή ενέργειας, ενώ στις μιξότροφες καλλιέργειες χρησιμοποιούνται οι οργανικές ουσίες για το σκοπό αυτό. Επομένως, η φωτοετερότροφη καλλιέργεια απαιτεί ταυτόχρονη χρήση σακχάρων και φωτός για την παραγωγή βιομάζας μικροφυκών (Liang, Sarkany, and Cui 2009).

1.4.7 Σύγκριση συνθηκών καλλιέργειας

Η ετερότροφη ανάπτυξη οδηγεί σε παραγωγή αυξημένης βιομάζας, σε σύγκριση με άλλες συνθήκες καλλιέργειας, προσελκύοντας το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Ωστόσο, η κλιμάκωση μεγέθους μίας ετερότροφης παραγωγής παρουσιάζει προβλήματα εξαιτίας των πιθανών μολύνσεων, ειδικά όταν οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε ανοικτά συστήματα. Επιπλέον, το κόστος της πηγής άνθρακα αποτελεί μείζον πρόβλημα. Η φωτοτροφική καλλιέργεια είναι η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη και η ευκολότερη. Ωστόσο, η παραγωγικότητα της είναι συνήθως χαμηλότερη από εκείνη της ετερότροφης καλλιέργειας, κυρίως εξαιτίας της αργής κυτταρικής ανάπτυξης και της χαμηλής παραγωγικότητας της βιομάζας. Από την άλλη πλευρά, το χαμηλό κόστος για την κλιμάκωση μεγέθους της

φωτοτροφικής καλλιέργειας καθιστά τη μέθοδο αυτή πολύ ελκυστική για παραγωγή άλλων σημαντικών προϊόντων. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες στη διεθνή βιβλιογραφία που σχετίζονται με τη χρήση μιξοτρόφης και φωτοετερότροφης καλλιέργειας για την παραγωγή βιομάζας από τα μικροφύκη, αφού οι δυο αυτές συνθήκες περιορίζονται από το ρίσκο της μόλυνσης και των απαιτήσεων σε φως, προϋποθέτοντας τον σχεδιασμό ενός ειδικού φωτοβιοαντιδραστήρα για την κλιμάκωση μεγέθους της διεργασίας, αυξάνοντας έτσι τα λειτουργικά έξοδα (Liang, Sarkany, and Cui 2009).

Πίνακας 1.3 Μέθοδοι καλλιέργειας μικροφυκών (Liang, Sarkany, and Cui 2009).

Συνθήκες καλλιέργειας	Πηγής ενέργειας	Πηγή άνθρακα	Πυκνότητα κυττάρων	Κλιμάκωση μεγέθους αντιδραστήρα	Κόστος	Προβλήματα κλιμάκωσης μεγέθους
Φωτοτροφική	Φως	Ανόργανη	Χαμηλή	Ανοικτή δεξαμενή	Χαμηλό	Χαμηλή πυκνότητα κυττάρων Υψηλό κόστος συμπύκνωσης
Ετερότροφη	Οργανική	Οργανική	Υψηλή	Συμβατικός επωαστήρας	Μέτριο	Μόλυνση Υψηλό κόστος υποστρώματος
Μιξότροφη	Φως και οργανική	Ανόργανη και οργανική	Μέτρια	Κλειστός φωτοβιοαντιδραστήρας	Υψηλό	Μόλυνση Υψηλό κόστος εξοπλισμού Υψηλό κόστος υποστρώματος
Φωτοετερότροφη	Φως	Οργανική	Μέτρια	Κλειστός φωτοβιοαντιδραστήρας	Υψηλό	Μόλυνση Υψηλό κόστος εξοπλισμού Υψηλό κόστος υποστρώματος

1.5 Χρήσιμα συστατικά που εξάγονται από μικροφύκη

1.5.1 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Τα μικροφύκη μπορούν να συνθέσουν όλες τις βιταμίνες που παράγουν και τα ανώτερα φυτά. Η συγκέντρωση σε βιταμίνες στα μικροφύκη ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος, την εποχή, το στάδιο ανάπτυξης των μικροφυκών και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Οι τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε) είναι λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά και βασικά θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους να προστατεύουν τα λιπίδια της μεμβράνης από επιβλαβή οξείδωση.

Τα μικροφύκη είναι γνωστό ότι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Περισσότερο από το 6.7 % του ξηρού βάρους των μικροφυκών είναι μέταλλα. Η περιεκτικότητα σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία γενικά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης, όπως το κλίμα, η εποχή και η θερμοκρασία (Kay and Barton 1991).

1.5.2 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι μία χημικώς ετερογενής ομάδα ενώσεων, οι οποίες στην πλειονότητά τους διαλύονται σε οργανικούς μη πολικούς διαλύτες και είναι αδιάλυτες στο νερό. Ωστόσο, υπάρχουν και υδατοδιαλυτά λιπίδια. Έτσι, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει εκείνα τα λιπίδια, που περιέχουν εστερομάδες και συνεπώς διαλύονται και στο νερό (λίπη, έλαια, κηροί), και η δεύτερη αφορά σ' αυτά που λόγω έλλειψης εστερομάδων είναι μη υδατοδιαλυτά (χοληστερόλη και στεροειδή).

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου είναι τα πολυακόρεστα (PUFAs).. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το λινολεϊκό οξύ (18:2 ωμέγα-6) και το α-λινοεϊκό οξύ (18:3 ωμέγα-3). Έτσι, λοιπόν, τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα πρέπει να παραλαμβάνονται στη διατροφή, γιατί η έλλειψή τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, η απουσία τους οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ενέργειας, μούδιασμα των άκρων, υψηλή πίεση αίματος, κατακράτηση υγρών, πεπτικές διαταραχές, φλεγμονές σε διάφορα σημεία του σώματος, αυξημένη προδιάθεση για εμφάνιση αλλεργιών, ελάττωση του ρυθμού του μεταβολισμού, καθώς και αύξηση του βάρους.

Τα κύτταρα των μικροφυκών περιέχουν λιπίδια σε ποσοστό κατά μέσο όρο 20-26% επί της ξηρής τους βιομάζας. Σε συνθήκες απουσίας των θρεπτικών συστατικών, το ποσοστό των λιπαρών οξέων αυξάνεται σημαντικά σε πολλά είδη μικροφυκών. Η παραγωγή λιπιδίων επίσης εξαρτάται και από το είδος της καλλιέργειας, αν αυτή δηλαδή είναι μιξότροφη ή αυτότροφη, με τη δεύτερη συνήθως να αποδίδει μεγαλύτερα ποσοστά λιπιδίων, με μικρότερη όμως παραγωγή βιομάζας στην καλλιέργεια και μικρότερη αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών.

Ένας άλλος τρόπος αύξησης της περιεκτικότητας σε λιπίδια είναι η μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας του μικροοργανισμού. Η χαμηλότερη θερμοκρασία εξυπηρετεί τη διατήρηση της ρευστότητας των μεμβρανών και συνεπώς τη διατήρηση των σωστών

κυτταρικών διεργασιών. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων περισσότερο ως προς το είδος, από ότι τη συνολική ποσότητα των λιπιδίων των κυττάρων. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να εκχυλιστούν με εξάνιο ύστερα από διάρρηξη των κυττάρων και ύστερα εξευγενίζονται και σταθεροποιούνται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών (MacDougall et al. 2011).

Τα λιπίδια που εξάγονται από τα μικροφύκη είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς βρίσκουν εφαρμογή όχι μόνο στον τομέα της διατροφής και της ενίσχυσης αυτής με όλα τα απαραίτητα λιπαρά οξέα που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός, αλλά και στην παραγωγή βιοκαυσίμων για την ενίσχυση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Τα μικροφύκη αποτελούν από τις πλέον υποσχόμενες πηγές λιπιδίων, που αποδίδονται για παραγωγή βιοντίζελ.

Το κλάσμα λιπιδίων, το οποίο ανακτάται από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, περιέχει τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και πολικά λιπίδια με κύρια τα φωσφολιπίδια, τις στερόλες, διάφορα καροτενοειδή καθώς και βιταμίνες A και D (Mulchandani, Kar, and Singhal 2015).

1.5.3 Πρωτεΐνες

Τα μικροφύκη είναι πλούσια πηγή πρωτεϊνών. Συνθέτουν όλα τα αμινοξέα που χρειάζονται και βρίσκουν συχνή εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα, εστιάζοντας στο στέλεχος *Chlorella pyrenoidosa*, αυτό εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε αμινικό άζωτο, περίπου 77 % επί ξηρού βάρους.

Η ποιότητα των πρωτεϊνών των τροφίμων εξαρτάται από τα απαραίτητα αμινοξέα τους. Τα μικροφύκη μπορούν να παρουσιάσουν υψηλή συγκέντρωση γλουταμινικού οξέος, ασπαρτικού οξέος, αλανίνης, αργινίνης, βαλίνης, λευκίνης, λυσίνης, θρεονίνης, ισολευκίνης και γλυκίνης, αν και τα κυρίαρχα αμινοξέα είναι η γλουταμίνη και το ασπαρτικό οξύ. Η γλουταμίνη και η ασπαργίνη εμφανίζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες στην ανάπτυξη της γεύσης.

Οι πρωτεΐνες που ανακτώνται από την εκχύλιση μικροφυκών βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε προϊόντα τροφίμων, ενισχύοντας τη διατροφική τους αξία. Οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών στα είδη μικροφυκών όπως το *A. platensis* και το *P. cruentum*, υποδηλώνουν ότι τέτοιες πρωτεΐνες έχουν υψηλό δυναμικό αν προστεθούν σε πολυάριθμα τρόφιμα. Έχουν

αντιοξειδωτικές δράσεις και ενισχύουν την διατροφή του ανθρώπου (Mobin, Chowdhury, and Alam 2019).

Πίνακας 1.4 Γενική σύνθεση σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες επί ξηρού βάρους βιομάζας διαφόρων μικροφυκών (Becker 2007).

Alga	Protein	Carbohydrates	Lipids
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Spirogyra</i> sp.	6–20	33–64	11–21
<i>Arthrospira maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	8–14	4–9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

1.5.4 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες μακράς αλυσίδας (π.χ. άμυλο, κυτταρίνη ή γλυκογόνο), που αποτελούνται από μονομερή μόρια, τους μονοσακχαρίτες. Οι τελευταίοι δίνουν συνήθως ενέργεια και ενισχύουν την δομή των κυττάρων, τα καθιστούν δηλαδή πιο ανθεκτικά με σκληρό κυτταρικό περίβλημα. Το εύρος των πολυσακχαρίτες που εξάγονται από μικροφύκη είναι σημαντικά αυξημένο τα τελευταία χρόνια. Υπό τις σωστές συνθήκες καλλιέργειας, τα μικροφύκη μπορούν να δώσουν εκχύλισμα πολυσακχαριτών από 15 % μέχρι και 55 % επί ξηρού βάρους βιομάζας. Μεταξύ των διαφόρων πολυσακχαριτών, οι θειικοί

πολυσακχαρίτες είναι οι πιο σημαντικοί καθώς είναι πηγή βιοδραστικών ενώσεων με αντιπηκτική, αντιθρομβωτική, αντιακή, αντικαρκινική και ανοσορρυθμιστική δράση.

Αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα σακχάρων τροφίμων, ως συντηρητικά και γενικά σαν φυσικά πρόσθετα σε πολλά προϊόντα τροφίμων. Η δράση τους είναι αντιοξειδωτική, καθώς επίσης η εφαρμογή τους οδηγεί σε συνεκτικότητα της πρώτης ύλης στην οποία ενσωματώνονται και σε βελτίωση ακόμα των ρεολογικών ιδιοτήτων αλλά και του ιξώδους των τροφίμων (Mobin, Chowdhury, and Alam 2019).

1.5.5 Φαινολικά οξέα και φαινολικές ενώσεις

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια σημαντική ομάδα φυσικών προϊόντων (που παράγονται από τα μικροφύκη ως δευτερογενείς μεταβολίτες) με αντιοξειδωτική δράση, ενώ βοηθούν στην άμυνα και την προστασία των μικροφυκών. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις δεν εμπλέκονται άμεσα στις πρωτογενείς τους διεργασίες, όπως είναι η φωτοσύνθεση, η κυτταρική διαίρεση και η αναπαραγωγή. Τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν πολλαπλά οφέλη, όπως αντιοξειδωτική δράση και προστασία από την ακτινοβολία UV. Έχει αναφερθεί ότι ορισμένα φαινολικά οξέα, που έχουν εξαχθεί από μικροφύκη, είναι το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το ρ-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ (Wan Mahmood et al. 2019).

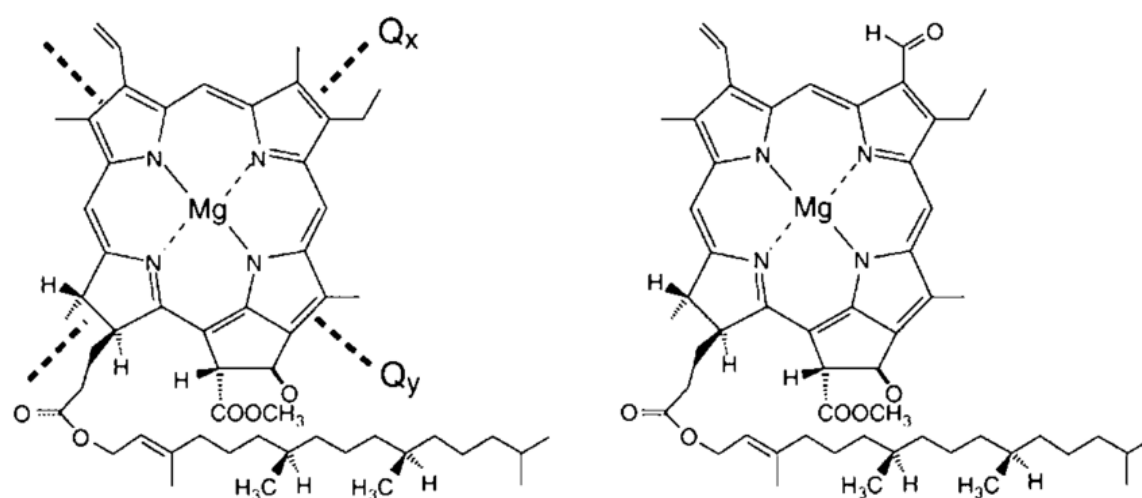
Στη βιομηχανία τροφίμων οι φαινολικές ενώσεις, οδηγούν στη επέκταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Η χρήση φαινολικών ενώσεων από φυσικές πηγές στα τρόφιμα είναι μια ενδιαφέρουσα ευκαιρία για παραγωγή τροφίμων χωρίς συντηρητικά για τους καταναλωτές. Οι πολυφαινόλες, που εξαγονται μέσω της εκχύλισης μικροφυκών, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται στην άμυνα απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία ή την προστασία από διάφορα παθογόνα μικρόβια. Αυτές βρίσκουν εφαρμογές σε τρόφιμα ή υποπροϊόντα τροφίμων, σε ποτά, φαρμακευτικά βότανα και μπαχαρικά. Η ποιότητα των τροφίμων επηρεάζεται από φυσικούς, χημικούς, βιοχημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες και ο έλεγχος αυτών των παραγόντων, ιδίως των τελευταίων, είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των τροφίμων. Η χρήση πρόσθετων τροφίμων φυσικής προέλευσης, αλλά και αντιοξειδωτικής δράσης, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, συνεπάγεται την απομόνωση, τον καθαρισμό, τη σταθεροποίηση και την ενσωμάτωση αυτών των ενώσεων σε τρόφιμα με αντιμικροβιακούς σκοπούς, χωρίς αυτό να επηρεάζει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη διατροφική αξία του προϊόντος. Τέλος, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν

να ενταχθούν σαν συστατικά στα βιολογικά λειτουργικά υλικά ενεργών και εδώδιμων συσκευασιών τροφίμων (Sara et al. 2016; Al Jitan, Alkhoori, and Yousef 2018).

1.5.6 Χρωστικές ουσίες

1.5.6.1 Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες των ανώτερων φυτών και των πράσινων μικροφυκών, αποτελούνται από τη χλωροφύλλη α, που αποτελεί την κύρια χρωστική και τη χλωροφύλλη β, η οποία εμφανίζεται ως βοηθητική. Και οι δύο χλωροφύλλες είναι συστατικά των χλωροπλαστών και εμφανίζονται σε αναλογία (α / β) περίπου 3 : 1. Οι συνθήκες ανάπτυξης και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν αυτήν την αναλογία α / β . Ο έντονος φωτισμός επηρεάζει αυτή την αναλογία και την τροποποιεί σε 3.2-4 : 1, ενώ σε χαμηλότερο φωτισμό η αναλογία λαμβάνει τιμές από 2.5 ως 2.9 προς 1. Σε κάθε περίπτωση η χλωροφύλλη α υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό. Παρακάτω φαίνεται η δομή της χλωροφύλλης α (αριστερά) και της β (δεξιά), (Halim et al. 2010; Lichtenthaler 1987).



Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση της χλωροφύλλης α (αριστερά) και β (δεξιά) (Halim et al. 2010).

Ο σκελετός του μορίου της χλωροφύλλης είναι ένας μεγάλος δακτύλιος πορφυρίνης, ο οποίος αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους πυρρολίου. Η προσάρτηση ενός μονού ισοκυκλικού δακτυλίου σε έναν από τους δακτυλίους πυρρολίου σχηματίζει την δομή της

φορβίνης. Κάθε πυρολικός δακτύλιος περιέχει τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου. Όλα τα άτομα αζώτου είναι εσωτερικά και δημιουργούν μια κεντρική οπή, όπου συνδέεται εύκολα ένα ιόν μαγνησίου Mg^{2+} . Στη χλωροφύλλη β, η μεθυλομάδα στον δακτύλιο II της χλωροφύλλης α, αντικαθίσταται από μία φορμυλομάδα (-CHO). Αυτή η διαφορά στη δομή δίνει στην α ένα μπλε, πράσινο χρώμα και οδηγεί στην μέγιστη απορρόφησή της στα 660-665 nm, ενώ στην χλωροφύλλη β δίνει ένα κίτρινο, πράσινο χρώμα και μέγιστο απορρόφησης τα 642-652 nm (Halim et al. 2010).

Όταν το κεντρικό άτομο μαγνησίου του τετραπυρρολίου αντικαθίσταται από δύο άτομα υδρογόνου στις χλωροφύλλες, παράγονται οι φαιοφυτίνες. Αυτή η αντίδραση γίνεται σε σχετικά υψηλές ή πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, όπου οι χλωροφύλλες υποβαθμίζονται.

Με την αυξανόμενη τάση της χρήσης φυσικών προσθέτων τροφίμων, οι χλωροφύλλες και οι παράγωγες ενώσεις τους, μπορούν να αντικαταστήσουν τα τεχνητά χημικά πρόσθετα, προάγοντας το προϊόν στο οποίο εισάγονται και την διατροφική του αξία. Ειδικότερα, χρησιμοποιούνται για τον χρωματισμό τροφίμων. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO 2019) ως πρόσθετο τροφίμων ορίζεται κάθε ουσία, που δεν καταναλώνεται σαν τρόφιμο αυτούσια και δεν χρησιμοποιείται ως συστατικό του τροφίμου, αλλά προστίθεται σκόπιμα στην παρασκευή, επεξεργασία, συσκευασία, μεταφορά και αποθήκευσή του. Σε συμφωνία με τη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων, τα πρόσθετα ταξινομούνται σε 25 κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν περίπου 230 διαφορετικές ενώσεις. Μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών προσθέτων τροφίμων, οι χλωροφύλλες και οι παράγωγες ενώσεις τους ταξινομούνται και χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα για το χρωματισμό των τροφίμων. Έτσι, αυτά τα μόρια χλωροφυλλών και παραγώγων τους, μπορούν να δώσουν, να εμβυθύνουν ή να ανανεώσουν το χρώμα, σε περίπτωση που αυτό έχει υποβαθμιστεί κατά τη διάρκεια της τεχνολογικής επεξεργασίας που υφίσταται το τρόφιμο, αποδίδοντας σε αυτά γαλάζιες και πράσινες αποχρώσεις (Jeevanandam et al. 2020; Halim et al. 2010; Lichtenthaler 1987; Solymosi and Mysliwa-Kurdziel 2016)

1.5.6.2 Καροτενοειδή

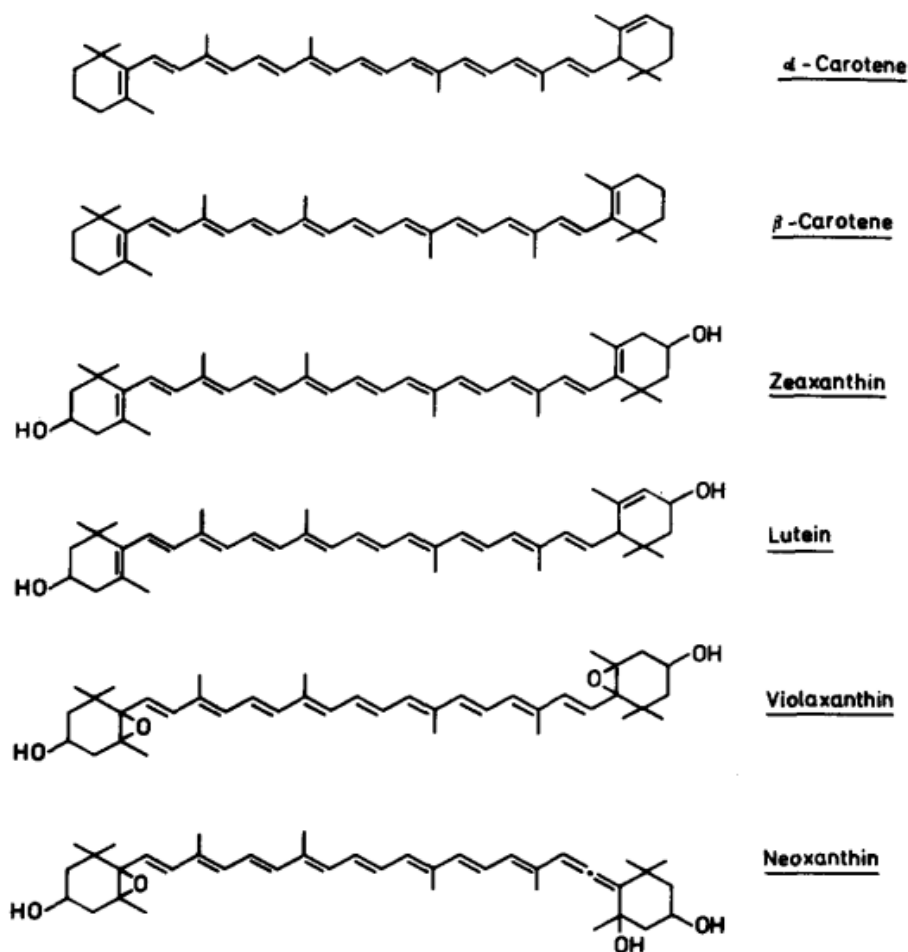
Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα των καροτενοειδών είναι η μακρά σειρά συζευγμένων διπλών δεσμών που σχηματίζουν το κεντρικό τμήμα του μορίου, δίνοντάς τους την ικανότητα απορρόφησης φωτός. Το χρώμα τους, από ανοιχτό κίτρινο μέχρι και κόκκινο, καθώς και οι

αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καροτενοειδών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από αυτούς τους διπλούς δεσμούς.

Η ομάδα των πρωτογενών φυτικών καροτενοειδών μπορεί να χωριστεί (1) στα καροτένια χωρίς οξυγόνο και (2) στις ξανθοφύλλες, οι οποίες περιέχουν οξυγόνο σε διαφορετικές μορφές, όπως μία ή περισσότερες υδρόξυ ή επόξυ ομάδες. Υπάρχουν δύο τύποι ισομερών σε κάθε επίπεδο οξείδωσης, τα παράγωγα καροτενίου (ένας δακτύλιος ε-ιοντόνης και ένας δακτύλιος β-ιοντόνης) και τα παράγωγα β-καροτενίου (2 δακτύλιοι β-ιοντόνης). Η εισαγωγή υδροξυ και εποξειδικών λειτουργικών ομάδων στο α-καροτένιο (ιονικοί δακτύλιοι) δημιουργούν τη λουτεΐνη και το εποξείδιο αυτής. Το β-καροτένιο είναι ο πρόδρομος των ξανθοφυλλών ζεαξανθίνης, βιολαξανθίνης και ανθεραξανθίνης. Τα καροτενοειδή των φυτικών ιστών που μετέχουν ενεργά στη φωτοσύνθεση, ταξινομούνται ως πρωτογενή καροτενοειδή, ενώ εκείνα των κόκκινων φρούτων και ανθέων έχουν χαρακτηριστεί ως δευτερεύοντα καροτενοειδή.

Τα καροτενοειδή περιλαμβάνουν β-καροτένιο, λουτεΐνη, βιολαξανθίνη και νεοξανθίνη ως κύρια συστατικά των φωτοχημικά ενεργών θυλακοειδών των χλωροπλαστών των ανώτερων φυτών και μικροφυκών. Ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και τις συνθήκες καλλιέργειας, πχ. έντονος φωτισμός, ή απουσία κάποιου θρεπτικού συστατικού, η ποσοστιαία σύνθεση των καροτενοειδών (% κατά βάρος) μπορεί να ποικίλει εντός των ορίων: β-καροτένιο 25-40%, λουτεΐνη 40- 57%, βιολαξανθίνη, 9-20% και νεοξανθίνη 5-13 % (Jeevanandam et al. 2020).

Παρακάτω εμφανίζεται η δομή κάποιων βασικών καροτενοειδών.



Εικόνα 1.10 Μοριακές δομές ορισμένων βασικών καροτενοειδών (Lichtenthaler 1987).

Λόγω της ευαισθησίας τους στο φως, τη θερμότητα, το οξυγόνο, την αυτοξειδωση και τον ισομερισμό, υπάρχουν αρκετά εμπορικά συντεθειμένα καροτενοειδή (π.χ. β-καροτένιο), τα οποία είναι αποδεκτά πρόσθετα χρώματος. Σήμερα, μερικά από τα πιο σημαντικά καροτενοειδή, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικές χρωστικές, παράγονται από μικροφύκη σε βιοαντιδραστήρες (τεχνολογία ζύμωσης). Μερικά από τα φυσικά καροτενοειδή (π.χ. β καροτένιο, ασταξανθίνη, λουτεΐνη) διατίθενται ευρέως στο εμπόριο, ενώ άλλα (π.χ., κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη, λυκοπένιο) χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά.

Οι αυξημένες αλλαγές των διατροφικών συνηθειών και απαιτήσεων οδήγησαν σε έναν σημαντικό μετασχηματισμό στις βιομηχανίες τροφίμων, οι οποίες στρέφονται μέχρι και σήμερα ολοένα και περισσότερο στην ενσωμάτωση πρόσθετων συστατικών στα προϊόντα διατροφής. Ο σκοπός αυτών των ενώσεων, είναι η ενσωμάτωση φυσικών προσθέτων και

συντηρητικών για την προαγωγή της διατροφικής αξίας των προϊόντων, αλλά και τη βοήθεια στη συντήρησή τους μέσω της αύξησης της διάρκειας ζωής τους, καθώς και τη βελτίωση τόσο των οργανοληπτικών όσο και των μικροβιολογικών ιδιοτήτων των βιομηχανοποιημένων τροφίμων.

Η μακρά πολυενική δομή των καροτενοειδών είναι υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά χρώματα και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Λόγω της μεγάλης αλυσίδας συζευγμένων διπλών δεσμών, απορροφώνται μπλε και πράσινα τμήματα του φάσματος του ορατού φωτός. Τα καροτενοειδή δεν δίνουν μόνο το χρώμα τους σε άνθη, φρούτα και λαχανικά αλλά είναι επίσης υπεύθυνα για τα έντονα χρώματα των φτερών των πτηνών, των τροπικών ψαριών και των οστρακοειδών. Επιπλέον, τα καροτενοειδή προστατεύουν άλλα μόρια από ανεπιθύμητες αντιδράσεις οξείδωσης, ενεργώντας αποτελεσματικά στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών. Η πλούσια σε ηλεκτρόνια αλυσίδα πολυενίου, η οποία μπορεί εύκολα να προσβληθεί από ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικά αντιδραστήρια, δωρίζει ηλεκτρόνια και άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.

Τα καροτενοειδή βρίσκουν υψηλή εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων ως φυσικές χρωστικές ενώσεις με χρήση τους και σαν φθορίζουσες ουσίες για ταυτοποίηση άλλων ενώσεων. Είναι κατάλληλα για αναψυκτικά και χυμούς, αφού έχουν κίτρινο αλλά και πορτοκαλί χρώμα, ενώ χρησιμοποιούνται, επίσης, για το χρωματισμό διαφόρων άλλων τροφίμων. Λόγω των βελτιωμένων διαδικασιών τυποποίησης καροτενοειδών, π.χ. με την εισαγωγή γαλακτωμάτων ή νανοσωματιδίων, τα χρώματα καροτενοειδών δείχνουν υψηλή σταθερότητα σε σχέση με το φως, τα οξέα και τη θερμότητα. Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, το προϊόν λαμβάνει ένα επιπλέον όφελος για τον καταναλωτή. Τα καροτενοειδή χρησιμοποιούνται επίσης ως πρόσθετα ζωικών τροφών και ως συμπληρώματα διατροφής υψηλής αξίας. Ως πρόσθετα, έχουν σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων. Στην Ευρώπη, είναι οι προτιμώμενοι παράγοντες χρωματισμού τροφίμων. Η παγκόσμια αγορά καροτενοειδών έφτασε τα 1.5 δισεκατομμύρια δολάρια το 2017 και αναμένεται να φτάσει τα 2.0 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2022, με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 5.7% για την περίοδο 2017 - 2022. Η αγορά καροτενοειδών χωρίζεται ανά τύπο, πηγή και εφαρμογή. Ανά τύπο, τα καροτενοειδή υποδιαιρούνται περαιτέρω σε β-καροτένιο, ασταξανθίνη, λουτεΐνη, κανθαξανθίνη, λυκοπένιο, ζεαξανθίνη και άλλα. Μεταξύ αυτών, το β-καροτένιο εκτιμάται ότι έχει τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Χρησιμοποιείται ευρέως για χρωματισμό τροφίμων και ως φυσικό πρόσθετο.

Σύμφωνα με τον Graca et al. 2018., πραγματοποιήθηκε μια δοκιμή για να εξεταστούν οι επιδράσεις της προσθήκης του καροτενοειδούς της λουτεΐνης, που εξάγεται από το μικροφύκος *Chlorella sp.* σε ζύμη ψωμιού. Η μελέτη αποκάλυψε ότι η προσθήκη περίπου 3 g αυτής ανά 100 g αλεύρου σίτου, οδήγησε σε βελτίωση της ρεολογίας της ζύμης, αλλά και των ιξωδοελαστικών χαρακτηριστικών αυτής, με ενίσχυση του δικτύου γλουτένης.

Προϊόντα που έχουν εμπλουτιστεί με φυσικά πρόσθετα τα καροτενοειδή, πέρα από το ενισχυμένο και έντονο χρώμα τους, καθώς και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, βοηθούν στην αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με την ωχρά κηλίδα του αμφιβληστροειδούς του ματιού και στην βελτίωση της όρασης.

Οι φόρμουλες μητρικού γάλατος που διατίθενται στο εμπόριο και είναι εμπλουτισμένες με λουτεΐνη και β-καροτένιο βρέθηκαν ότι είναι ασφαλείς για να υποστηρίξουν την ομαλή ανάπτυξη των βρεφών (Jeevanandam et al. 2020).

1.6 Ξήρανση μικροφυκών

Στη βιομηχανία των τροφίμων η ξήρανση αποτελεί μια σημαντική διεργασία. Ο βασικός στόχος της διεργασίας αυτής είναι η απομάκρυνση του νερού, ώστε να μειωθεί η μικροβιακή ανάπτυξη και η πιθανή αλλοίωση από επιμέρους χημικές αντιδράσεις. Οδηγεί, ακόμη, στη μείωση του βάρους και του όγκου των στερεών, ελαχιστοποιώντας με αυτό τον τρόπο και το κόστος παραγωγής, μεταφοράς και αποθήκευσης του τελικού προϊόντος. Τα μικροφύκη μετά την καλλιέργεια και συγκομιδή τους, υφίστανται ξήρανση προκειμένου να μην υποβαθμιστούν τα βιοδραστικά τους συστατικά και αλλοιωθούν από άλλους μικροοργανισμούς.

Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι ξήρανσης που εφαρμόζονται στα μικροφύκη είναι η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), η ξήρανση υπό κατάψυξη ή λυοφιλίωση (freeze drying), η ηλιακή ξήρανση (solar drying), η ξήρανση υπό κενό (vacuum drying), η συμβατική ξήρανση με θερμό αέρα (hot air drying) και η ατμοσφαιρική ξήρανση (atmospheric drying), (Show et al. 2015).

1.7 Σύνοψη

Στη βιομηχανία τροφίμων, τα τελευταία χρόνια, τα μικροφύκη έχουν χαρίσει πληθώρα εφαρμογών, τόσο σαν συμπληρώματα διατροφής, όσο και σαν υπερτροφές ή προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας. Τα βιοδραστικά τους συστατικά, που προκύπτουν στο εκχύλισμα όταν διαρρηγνύεται το κύτταρο τους, είναι πολύτιμα. Ειδικότερα, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, μελετήθηκε το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* το οποίο είναι πλούσιο σε χρωστικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και αυτές δεν είναι άλλες από τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή.

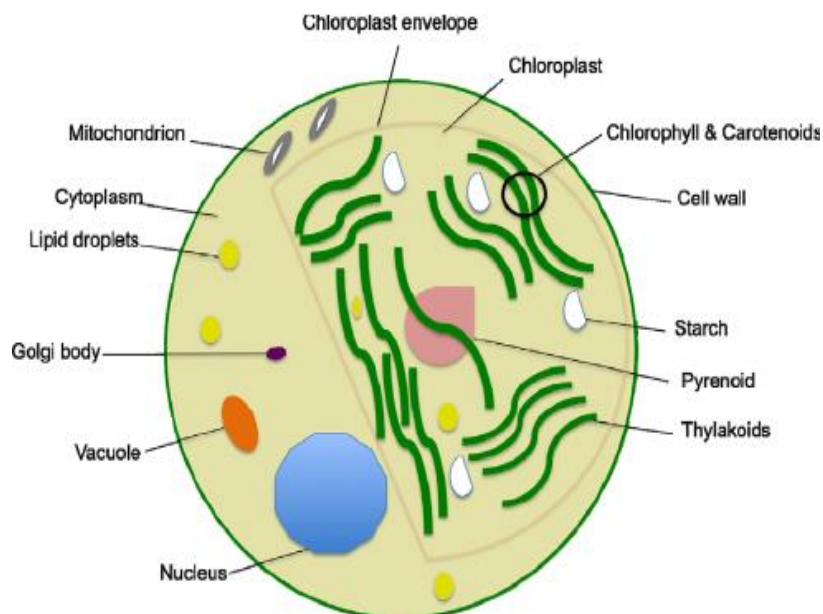
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Chlorella pyrenoidosa

2.1 Δομή και λειτουργία του κυττάρου του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*

2.1.1 Μορφολογία κυττάρου

Το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, ανήκει στην κατηγορία των χλωροφυκών και αποτελεί ένα σφαιρικό, μονοκύτταρο, ακίνητο μικροφύκος. Αναπαράγεται αγενώς με μιτωτικές διαιρέσεις βλαστητικών κυττάρων από τα οποία προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα. Όπως τα περισσότερα μικροφύκη έτσι και το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* παρουσιάζει ένα παχύ και σκληρό κυτταρικό τοίχωμα του οποίου η διάρρηξη είναι αρκετά απαιτητική. Ο πυρήνας του κυττάρου περιέχει όλες τις γενετικές πληροφορίες, ενώ στο κυτταρόπλασμα βρίσκονται διάσπαρτα τα οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα κεντόπια αλλά και διάφορα σταγονίδια λιπιδίων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, στο εσωτερικό του κυττάρου, σχηματίζεται ένα κομμάτι που καλείται εξαιτίας του σχήματος και του περιεχομένου του, «φάκελος χλωροπλαστών». Σε αυτό βρίσκονται οι χλωροπλάστες και τα θυλακοειδή που σχηματίζονται από τις στοίβες των χλωροφυλλών, οι χρωστικές αυτές ουσίες, χλωροφύλλες και καροτενοειδή, ο πυρηνίσκος και σταγονίδια αμύλου. Το άμυλο, αποτελεί κύριο συστατικό, που παράγεται και αποθηκεύεται στο κύτταρο από τη διεργασία της φωτοσύνθεσης, λόγω του ότι τα πράσινα μικροφύκη είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φρέσκο νερό (Dvoretzky et al. 2016).



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση του κυττάρου του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* (Safi et al. 2014).

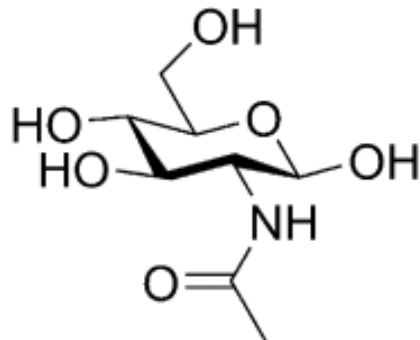
2.1.2 Πυρήνας

Ο πυρήνας είναι το μεγαλύτερο οργανίδιο του κυττάρου. Έχει σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές και αποτελεί το κέντρο ελέγχου του κυττάρου. Εκεί βρίσκεται το γενετικό υλικό DNA, στο οποίο είναι καταγραμμένες οι πληροφορίες για όλα τα χαρακτηριστικά του μικροφύκου τόσο τα δομικά όσο και τα λειτουργικά. Ο πυρήνας ελέγχει, επίσης, τις κυτταρικές δραστηριότητες. Περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη, πυρηνική, με ανοίγματα (πόρους), μέσω των οποίων γίνεται ανταλλαγή μορίων μεταξύ του πυρήνα και του υπόλοιπου κυττάρου (Dvoretzky et al. 2016).

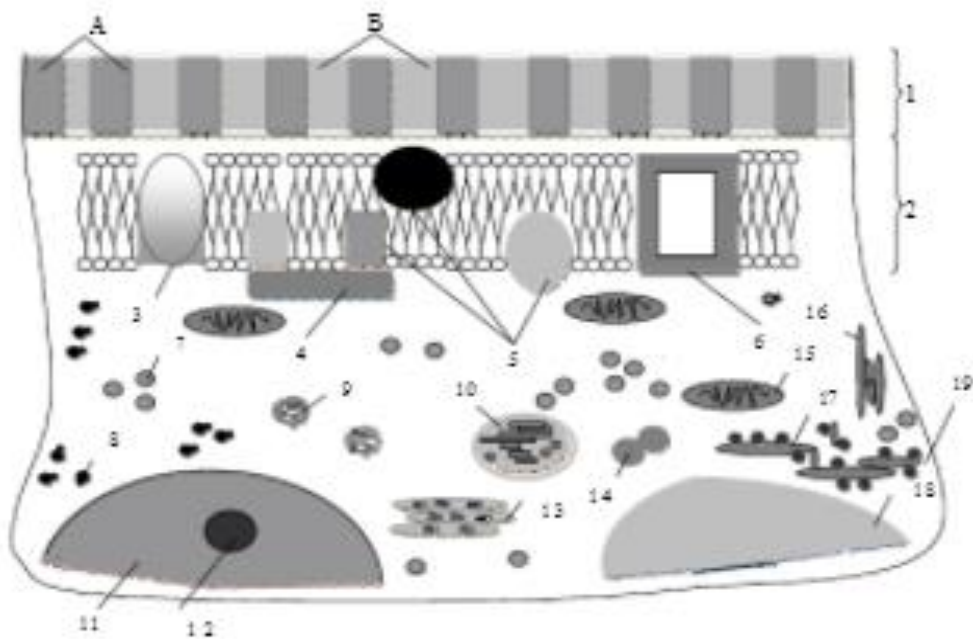
2.1.3 Κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα (1) αποτελείται από μια μεμβράνη πολυμερούς με συστατικά, όπως η μικροΐνη Α, της οποίας κύριο πολυμερές είναι η πολυ-1,4-DN- β -ακετυλο-γλυκοζαμίνη, η οποία συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου και μία μήτρα Β, η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες και πολύπλοκους πολυσακχαρίτες όπως ημικυτταρίνες και πηκτίνες. Η Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι παράγωγο αμιδίου του μονοσακχαρίτη της γλυκόζης, ένα

δευτερογενές αμίδιο μεταξύ της γλυκοζαμίνης και του αιθανικού οξέος (Dvoretzky et al. 2016).

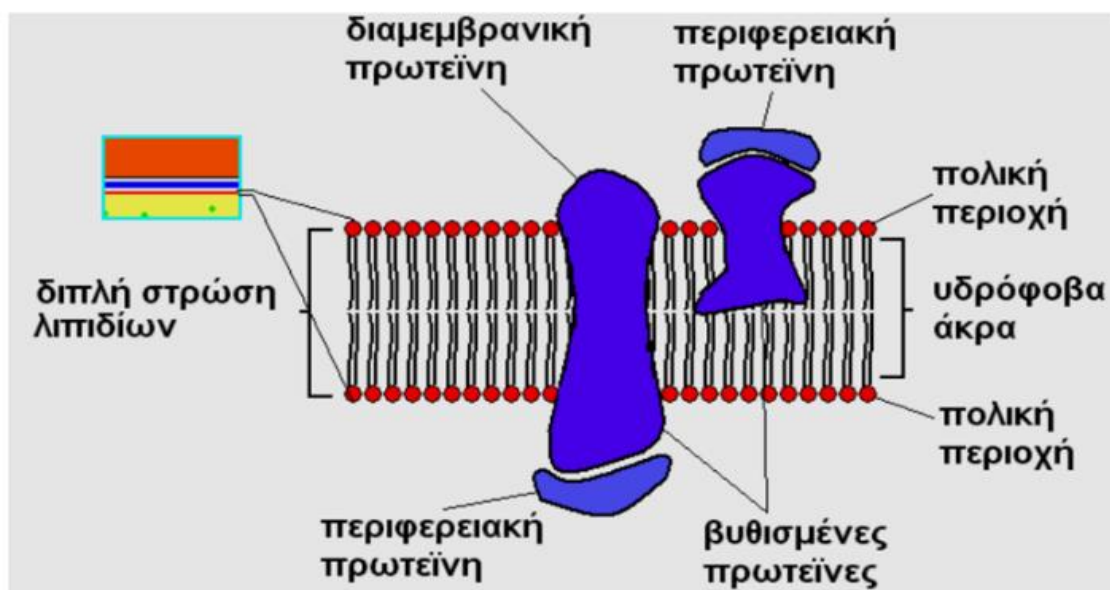


Εικόνα 2.2 N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Shrotri, Kobayashi, and Fukuoka 2017)



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση κυττάρου *Chlorella pyrenoidosa*. Το κύτταρο της περικλείεται από το κυτταρικό τοίχωμα (1), μια πλασματική μεμβράνη (2), που αποτελείται από φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, πρωτεΐνες μεταφοράς και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (3), περιφερικές πρωτεΐνες (4), βυθισμένες πρωτεΐνες (5), ένα κανάλι ιόντων (6), σταγονίδια λιπιδίων (7) ριβοσώματα (8), συμπλέγματα πρωτεϊνών-λιπιδίων (9), χλωροπλάστες (10), πυρήνα (11) πυρηνίσκο (12), δίκτυο Golgi (13), λυσοσώματα και υπεροξυσωμάτια (14), μιτοχόνδρια (15), ενδοπλασματικό δίκτυο (16), κοκκώδες ενδοπλασματικό δίκτυο (17) κενοτόπιο (18) και κυτταρόπλασμα (19), (Dvoretzky et al. 2016).

2.1.4 Κυτταρική μεμβράνη



Εικόνα 2.4 Μεγέθυνση δομής πλασματικής μεμβράνης και των στοιχείων αυτής, πρωτεϊνών και λιπιδίων (Αγγελής, 2007)

Η κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη, περιβάλλει το κύτταρο και το ξεχωρίζει από το περιβάλλον του. Βρίσκεται κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα προς την εσωτερική μεριά του κυττάρου. Αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων ενωμένα εκατέρωθεν από ένα ενδιάμεσο στρώμα αποτελούμενο από πρωτεΐνες και σάκχαρα. Είναι ημιπερατή, επιτρέπει δηλαδή σε ορισμένες μόνο ουσίες να εισέρχονται και να εξέρχονται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης που δημιουργείται στα εξωτερικά άκρα της μεμβράνης, λόγω του ηλεκτρικού φορτίου που περιέχει αλλά και της διαφοράς της συγκέντρωσης του εξωτερικού από το εσωτερικό υγρό με συνέπεια να δημιουργείται διαφορά ωσμωτικών πιέσεων, μέσω των οποίων προσδιορίζεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Πιο συγκεκριμένα, η πλασματική μεμβράνη αποτελείται από γλυκεροφωσφολιπίδια, τα οποία παρουσιάζουν μια υδρόφιλη κεφαλή και μία υδρόφοβη ουρά, διευθετημένα σε μία λιπιδική διπλοστοιβάδα. Τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια αποτελούνται από κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία τοποθετούνται παράλληλα και δίνουν συμπυκνωμένη μορφή στη μεμβράνη. Ωστόσο, παρατηρούνται και φωσφολιπίδια με ακόρεστους δεσμούς, όπου οι

λιπαρές αλυσίδες δεν είναι παράλληλα τοποθετημένες για να αποφευχθεί η κάμψη της στοιβάδας, λόγω των διπλών δεσμών τους. Ακόμα, μόρια χοληστερόλης εντοπίζονται ευθυγραμμισμένα και στα δύο μέρη της στοιβάδας, ανάμεσα στα φωσφολιπίδια.

Εκτός από τα γλυκεροφωσφολιπίδια που αναφέρθηκαν, κατά μήκος της στοιβάδας υπάρχουν γλυκερολιπίδια, σφιγγολιπίδια και στερόλες. Τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια είναι πολικά λιπίδια που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα καθώς επίσης και στις μεμβράνες εσωτερικών οργάνων όπως οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, ουδέτερα λιπίδια όπως η τριακυλογλυκερόλη έχουν τη μορφή σταγονιδίων λιπιδίων στη μήτρα χλωροπλάστων και μπορούν επίσης να είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα (Dvoretzky et al. 2016).

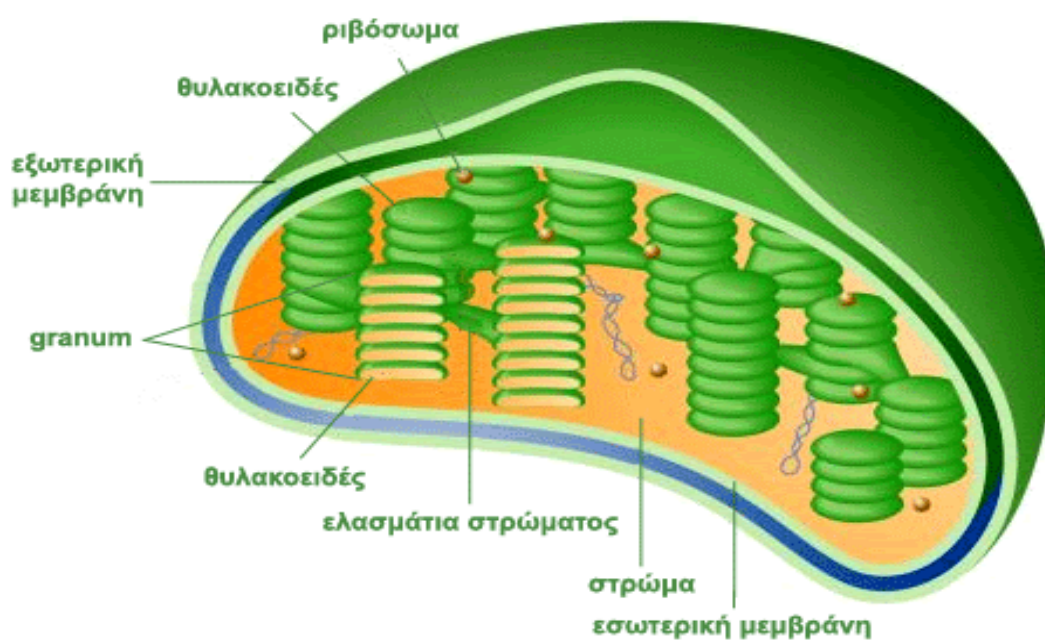
2.1.5 Χλωροπλάστες

Οι χλωροπλάστες είναι μεγάλα πράσινα οργανίδια που υπάρχουν μόνο σε φωτοσυνθετικά κύτταρα. Η δομή τους είναι πιο πολύπλοκη από την αντίστοιχη των μιτοχονδρίων. Εκτός από τις δύο περιβάλλουσες μεμβράνες του, στο εσωτερικό του χλωροπλάστη υπάρχουν στοιβάδες μεμβρανών που περιέχουν μια πράσινη χρωστική, τη χλωροφύλλη. Στους χλωροπλάστες διεκπεραιώνεται η φωτοσύνθεση. Κατά την φωτοσύνθεση, η ηλιακή ενέργεια δεσμεύεται από τα μόρια της χλωροφύλλης και πραγματοποιείται η σύνθεση πλούσιων σε ενέργεια μορίων σακχάρων. Κατά τη διεργασία της φωτοσύνθεσης ελευθερώνουν οξυγόνο σαν παραπροϊόν. Στους χλωροπλάστες βρίσκονται και τα καροτενοειδή, βασικές χρωστικές ουσίες που απορροφούν στη μπλε περιοχή (μεταξύ 400 και 500 nm). Τα κύρια καροτενοειδή των χλωροπλάστων είναι το β-καροτένιο σε ποσοστό 25-30 % και οι ξανθοφύλλες, η λουτεΐνη σε ποσοστό 45 %, η βιολαξανθίνη σε ποσοστό 10-15 % και η νεοξανθίνη σε ίσο ποσοστό 10-15%.

Η χλωροφύλλη συναντάται «στοιβαγμένη» σε μορφή κόκκων στα τοιχώματα των ελασμάτων ή αλλιώς θυλακοειδών (grana), οργανιδίων που έχουν μορφή πεπλατυσμένων σάκων. Τα θυλακοειδή αυτά σχηματίζουν φωτοσυνθετικούς κόκκους. Το ρευστό εσωτερικό μέρος του χλωροπλάστη καλείται στρώμα (stroma) και περιέχει το κυκλικό DNA και τα ριβοσώματα. Εν τούτοις, οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του χλωροπλάστη κωδικοποιούνται από τα γονίδια του DNA του πυρήνα των κυττάρων. Μέσα στο στρώμα βρίσκονται τα θυλακοειδή (thylakoids), όπου πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση. Ένας σωρός θυλακοειδών λέγεται granum. Ένα θυλακοειδές (thylakoid) μοιάζει με έναν ισιωμένο δίσκο, και το εσωτερικό είναι μια κενή περιοχή αποκαλούμενη το διάστημα ή έλασμα θυλακοειδών. Οι φωτεινές

αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης γίνονται στους χλωροπλάστες, ενώ οι σκοτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στην υδατώδη μήτρα που περιβάλλει τα ελάσματα των χλωροπλάστων.

Οι χλωροπλάστες συλλέγοντας την ενέργεια από το φως του ηλίου, παράγουν ελεύθερη ενέργεια αποθηκευμένη σε ATP και NADPH μέσω της φωτοσύνθεσης (Dvoretzky et al. 2016; Lichtenthaler 1987).



Εικόνα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση δομής χλωροπλάστη (Αγγελής, 2007).

2.2 Χρήσιμα συστατικά του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*

2.2.1 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.1**, στο μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* βρίσκονται οι παρακάτω βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία.

Πίνακας 2.1 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* (Mobin, Chowdhury, and Alam 2019).

<i>Chlorella</i>		<i>Chlorella</i>	
Vitamins		Vitamins	
Provitamin A	55500 IU kg ⁻¹	Vitamin B ₆	17
Beta-Carotene	1808	Vitamin B ₁₂	1259
Vitamin E	<10 IU kg ⁻¹	Inositol	1650
Thiamin B ₁	15	Folic acid	269
Riboflavin B ₂	48	Biotin	1916
Niacin B ₃	238	Pantothenic acid	13

Όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 2.1**, το συγκεκριμένο μικροφύκος είναι πολύ πλούσια πηγή της βιταμίνης B₁₂. Επομένως, μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική πηγή αυτής της βιταμίνης για χορτοφάγους ή vegans.

Η περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα 2.2**.

Πίνακας 2.2 Περιεκτικότητα σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία που παρουσιάζουν το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* σε mg/kg (Mobin, Chowdhury, and Alam 2019).

Microalgae	Na ^a	K ^a	Mg ^a	Ca ^a	P ^a	F ^b	Zn ^b	Cu ^b	Mn ^b	Cr ^b	B ^b
<i>Chlorella</i>	10.4	11	3.53	2.3	19.2	1,185	24.7	6.21	77.8	1.38	27.5

2.2.2 Λιπίδια

Το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* είναι σε θέση να παράγει λιπίδια σε επίπεδα έως και 20-50% του ξηρού κυτταρικού βάρους του υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Αυτά τα λιπίδια, κυρίως με τη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAGs), μπορούν να μετατραπούν σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) και να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαύσιμα, όπως τα λιπίδια από τα ανώτερα φυτά. Εκτός από τα TAGs, το κλάσμα λιπιδίων των μικροφυκών μπορεί επίσης να περιλαμβάνει χλωροφύλλες, καροτενοειδή, γλυκολιπίδια, φωσφολιπίδια και στερόλες. Υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, συνθέτει λιπαρά οξέα για την παραγωγή λιπιδίων μεμβράνης, τα οποία περιλαμβάνουν γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια. Ωστόσο, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, η βιοσυνθετική οδός του συγκεκριμένου στελέχους μεταβάλλεται και αρχίζει να παράγει ουδέτερα λιπίδια για αποθήκευση ενέργειας, κυρίως με τη μορφή TAGs. Οι τριακυλογλυκερόλες, αυτές, προτιμώνται από τα φωσφολιπίδια ή τα γλυκολιπίδια για παραγωγή βιοκαυσίμων λόγω του υψηλότερου ποσοστού λιπαρών οξέων και της έλλειψης φωσφόρου και θείου (MacDougall et al. 2011; Mulchandani, Kar, and Singhal 2015).

2.2.3 Πρωτεΐνες

Παρακάτω, στον **Πίνακα 2.3** εμφανίζεται τυπική σύσταση σε αμινοξέα του στελέχους της *Chlorella pyrenoidosa* συγκριτικά με το στέλεχος της *Chlorella vulgaris* (Schieler, McCLure, and Dunn 1953).

Πίνακας 2.3 Σύσταση αμινοξέων στο μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* και *Chlorella vulgaris* (Schieler, McCLure, and Dunn 1953).

Amino acid	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>
	Authors	Combs (8)		Emerson ¹
	g	h	i	Authors
Alanine.....	5.59	5.24
Arginine.....	6.07	4.71	5.97	3.82
Aspartic acid.....	7.91	6.32
Cystine.....	0.83	0.61
Glutamic acid.....	8.65	7.60
Glycine.....	4.25	5.50	4.80
Histidine.....	2.00	1.44	1.62	1.42
Isoleucine.....	5.31	4.00	4.23	5.93
Leucine.....	8.71	8.66	4.98	8.37
Lysine.....	5.13	4.71	6.08	2.23 ^k
Methionine.....	0.48	0.82	1.45	0.96
Phenylalanine.....	4.97	4.14	5.35	11.58
Proline.....	3.99	3.48
Threonine.....	4.32	4.85	4.78	2.26
Tryptophan.....	1.22	1.83	1.05	1.11
Tyrosine.....	1.77	3.24
Valine.....	5.72	5.65	6.67	5.29
Total.....	76.9	74.2

[†] Values given as per cent amino acid of protein (N × 6.25) in extracted, dried cells.
[‡] Nitrogen, 6.93%; moisture, 8.27%; ash, 1.03%.
[§] Nitrogen, 7.0 (44.0/6.25)%. Microbiological assay by Food Research Laboratories of cells grown by Arthur D. Little, Inc.
[¶] Nitrogen, 6.4 (40.0/6.25)%. Microbiological assay by Merck and Company of cells grown by Spoehr and Milner (3).
¹ Nitrogen, 6.54%; moisture, 10.15%; ash, 0.08%.
^k Value seems to be incorrect.

2.2.4 Υδατάνθρακες

Το κυτταρικό τοίχωμα της *Chlorella pyrenoidosa*, όπως και των χλωροφυκών γενικότερα, παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες, που αγγίζει το 80%, συμπεριλαμβανομένης και της κυτταρίνης. Συγκεκριμένα περιέχει την β-1-3 γλυκάνη, το άμυλο και κυτταρίνη καθώς και άλλους πολυσακχαρίτες χρήσιμους για την συνοχή του κυτταρικού της περιβλήματος (Vale et al. 2020; Mobin, Chowdhury, and Alam 2019)

2.2.5 Φαινολικές ενώσεις

Στο μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa* βρίσκονται σε μικρό ποσοστό φαινολικά οξέα με κύρια το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε μικρό ποσοστό μέσα στο κύτταρο του εν λόγω μικροφύκου. (Wan Mahmood et al. 2019).

2.2.6 Χρωστικές ουσίες

Στο στέλεχος του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, συναντώνται τόσο οι χλωροφύλλες όσο και ορισμένα καροτενοειδή. Στο εν λόγω μικροφύκος, όπως αποκαλύπτει και η παρούσα μελέτη, βρίσκονται τόσο η χλωροφύλλη α και β όσο και η λουτεΐνη, ως βασικό καροτενοειδές. Αυτές οι χρωστικές ουσίες είναι κύρια συστατικά των χλωροπλαστών του μικροφύκου και απορροφούν όπως προαναφέρθηκε στα 470 και 649 nm. (Lichtenthaler 1987; Mobin, Chowdhury, and Alam 2019).

2.3 Εφαρμογές και οφέλη των βιοδραστικών συστατικών των μικροφυκών

2.3.1 Φαρμακευτική

Η εφαρμογή των βιοδραστικών συστατικών που εξάγονται από μικροφύκη βρίσκουν πολλές εφαρμογές και στη φαρμακευτική. Οι βιοδραστικές αυτές ενώσεις, όπως είναι η κυανοβιρίνη, το ελαϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ, το παλμιτολεϊκό οξύ, οι βιταμίνες E και B12, το β-καροτένιο, η φυκοκυανίνη, η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη εκτελούν ένα ευρύ φάσμα προστατευτικών δράσεων, παρουσιάζοντας αντιπηκτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές και αντιϊκές δράσεις, και λειτουργούν ως παράγοντες πρόληψης ασθενειών. Οι θειικοί πολυσακχαρίτες από διάφορα στελέχη του μικροφύκου *Chlorella sp.* χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιϊκός παράγοντας. Ορισμένα στελέχη *Chlorella sp* περιέχει επίσης μια σημαντική ουσία που ονομάζεται β-1,3-γλυκάνη. Αυτή η ένωση είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος διεγείρει την ανοσοαπόκριση και είναι υπεύθυνος για τη μείωση των λιπιδίων στο αίμα. Είναι επίσης αποτελεσματική στο έλκος του στομάχου, στην απομάκρυνση τοξικών στοιχείων από το σώμα και στην επούλωση

τραυμάτων. Έχει προληπτική δράση στην υπερχοληστερολαιμία. Τα εκχυλίσματα από μικροφύκη *Chlorella sp.* μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, να αυξήσουν τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης και να δράσουν ως παράγοντας προστασίας του ήπατος. Οι καθαρές φυκοβιλιπρωτεΐνες μπορούν να έχουν θεραπευτικές δράσεις λειτουργώντας ως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικοί παράγοντες, μπορούν να ενισχύσουν φωτοδυναμικές θεραπείες διαφόρων καρκινικών όγκων καθώς και της λευχαιμίας. Η βιταμίνη E, επίσης, έχει επίδραση στην πρόληψη πολλών ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, οι καρδιακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Mobin, Chowdhury, and Alam 2019; Jeevanandam et al. 2020; Kay and Barton 1991).

Τα καροτενοειδή, από την άλλη, έχουν επίσης μεγάλες δυνατότητες για τη θεραπεία εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας και ο καταρράκτης των ματιών. Η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται για την πρόληψη πολλών ανθρώπινων παθολογικών διεργασιών, όπως φωτοοξείδωση που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, φλεγμονές, καρκινογένεση προστάτη και μαστού, έλκη και ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Το β-καροτένιο, λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής ιδιότητάς του, έχει προταθεί ως αντικαρκινικός παράγοντας και παράγοντας πρόληψης χρόνιων παθήσεων, αναστολέας του έλκους, της καρδιακής προσβολής και της στεφανιαίας νόσου. Είναι επίσης αποτελεσματικό στον έλεγχο της χοληστερόλης στο αίμα (Lichtenthaler 1987; Solymosi and Mysliwa-Kurdziel 2016; Jeevanandam et al. 2020)

Ορισμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν θεραπευτικές ιδιότητες. Τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα χοληστερόλης και λίπους στο αίμα και να αποφράξουν αιμοφόρα αγγεία. Η ιατρική χρήση, λοιπόν, των ω-3 λιπαρών οξέων για την πρόληψη και τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και των ασθενειών ανοσοανεπάρκειας αυξάνεται ολοένα και περισσότερο (Lichtenthaler 1987; Solymosi and Mysliwa-Kurdziel 2016; Jeevanandam et al. 2020).

2.3.2 Βιομηχανία τροφίμων και εφαρμογές χρωστικών ουσιών

Τα λειτουργικά συστατικά των εκχυλισμάτων από μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της διατροφής του ανθρώπου. Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα από τον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η ποιότητα των πρωτεϊνών των μικροφυκών είναι μεγαλύτερη από άλλες πηγές λαχανικών, για παράδειγμα, σιτάρι, ρύζι και όσπρια, αλλά φτωχότερη από τις ζωικές πηγές, για παράδειγμα γάλα και κρέας. Λόγω των αντιοξειδωτικών δράσεων ορισμένων συστατικών τους, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μιας ποικιλίας συμπληρωμάτων διατροφής που διατίθενται στο εμπόριο σε διάφορες μορφές, όπως δισκία, κάψουλες, υγρά αλλά και ως ξηρή βιομάζα. Τα συστατικά των μικροφυκών εφαρμόζονται επίσης και σε διάφορα προϊόντα τροφίμων, όπως για παράδειγμα ζυμαρικά, σνακς, μπισκότα, παγωτά, καραμέλες, ροφήματα για την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας και την βελτίωση των οργανοληπτικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Τα αποξηραμένα εκχυλίσματα βιομάζας, που παράγονται από τα *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* και *Spirulina sp.* έχουν κυριαρχήσει στην αγορά διατροφικών φαρμάκων ή τροφίμων και αξίζουν συλλογικά εκατοντάδες εκατομμύρια δολάρια.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε εκχύλιση χρωστικών ουσιών με αντιοξειδωτική δράση από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, συγκεκριμένα χλωροφυλλών α και β και καροτενοειδών με κύριο τη λουτεΐνη.

Προκειμένου, να εξαχθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βιοδραστικά συστατικά από τα μικροφύκη απαιτείται η χρήση μεθόδων διάρρηξης του εξαιρετικά σκληρού κυτταρικού τοιχώματος που τα περιβάλλει. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν την εξαγωγή χρωστικών από μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένων των τάσεων της αγοράς, της διαθέσιμης τεχνολογίας, του κόστους εγκατάστασης και της εξοικονόμησης χρόνου και ενέργειας. Η πιο βασική μέθοδος είναι η εκχύλιση, η οποία, συνήθως, απαιτεί μια βοηθητική μέθοδο διάσπασης κυττάρων και έναν συμβατό διαλύτη.

Τα μικροφύκη περιέχουν διάφορα είδη φυσικών χρωστικών. Πράσινες χρωστικές αποτελούν οι χλωροφύλλες και κίτρινες, κόκκινες ή πορτοκαλί τα καροτενοειδή. Αυτές οι χρωστικές μπορούν να απομονωθούν από τα μικροφύκη και να βρουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακευτική βιομηχανία, τη βιομηχανία καλλυντικών και τη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας. Ωστόσο, οι φυσικές χρωστικές δεν είναι σταθερές και γι' αυτό παρουσιάζουν επιμέρους δυσκολίες στη εφαρμογή τους. Στα μικροφύκη, οι χρωστικές

ουσίες καθιστούν πιο αποτελεσματική την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας μέσω των φυκοβιλιπρωτεϊνών, και τα προστατεύουν από την ηλιακή ακτινοβολία με τα καροτενοειδή. Τα καροτενοειδή που λαμβάνονται από μικροφύκη έχουν σημαντική θέση στην αγορά. Συγκεκριμένα, ακολουθούν ορισμένες από τις εμπορικές τους χρήσεις:

- Το β-καροτένιο, ως πρόδρομος βιταμίνης Α χρησιμοποιείται ως πρόσθετο για την ενίσχυση του χρώματος της σάρκας των ψαριών και του κρόκου των αυγών.
- Η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται στην υδατοκαλλιέργεια για την ενίσχυση του χρώματος των μυών των ψαριών (για παράδειγμα: μύος ψαριού σολομού) και για τη φωτεινότητα του χρώματος των κελυφών.
- Η λουτεΐνη, που λαμβάνεται και από το στέλεχος *Chlorella pyrenoidosa* χρησιμοποιείται για χρωματισμό δέρματος κοτόπουλου ή για φαρμακευτικούς σκοπούς.
- Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες και η φυκοερυθρίνη των φυκών χρησιμοποιούνται ως χρωστικές σε τρόφιμα και καλλυντικά. Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες χρησιμοποιούνται και ως δείκτες φθορισμού για τη γενετική εξέταση στην ανάλυση κυττάρων.
- Η φυκοκυανίνη χρησιμοποιείται ως βαφή στη βιομηχανία τροφίμων (παγωτό, καραμέλες, μη αλκοολούχα ποτά και διαιτητικά τρόφιμα), στη βιομηχανία καλλυντικών και στη φαρμακοβιομηχανία. Χρησιμοποιείται, επίσης, ευρέως σε κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια ανοσολογίας, καθώς είναι αποτελεσματικό στη μοριακή απορρόφηση και έχει υψηλή ικανότητα φθορισμού και φωτοσταθερότητα. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων έχει καθιερωθεί ως ένα ισχυρό αντιδραστήριο φθορισμού (Lichtenthaler 1987; Solymosi and Mysliwa-Kurdziel 2016; Jeevanandam et al. 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εκχύλιση υποβοηθούμενη
από μεθόδους κυτταρικής
διάρρηξης

3.1 Εισαγωγή

Όσον αφορά τη διαθέσιμη τεχνολογία, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι εξαγωγής βιοδραστικών συστατικών από μικροφύκη τα τελευταία χρόνια. Γενικά, το σκληρό και συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για την εκχύλιση των διαφόρων συστατικών των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό η διάρρηξη των κυττάρων με χρήση διάφορων μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης είναι υψίστης σημασίας, ελαττώνοντας τον χρόνο και αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης. Η διάρρηξη των κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε (i) μη μηχανικά, όπως με χημικές, θερμικές και ενζυματικές μεθόδους, είτε (ii) μηχανικά, όπως με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, υπερήχους, μικροκύματα, και με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Ορισμένα συστήματα, όμως, βασίζονται και στη συνέργεια μεταξύ μη μηχανικών και μηχανικών μεθόδων, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως είναι η περιεκτικότητα των διαλυτών, η θερμοκρασία και ο τεχνολογικός εξοπλισμός (π.χ. εκχύλιση με μικροκύματα, και με παλμικά ηλεκτρικά πεδία).

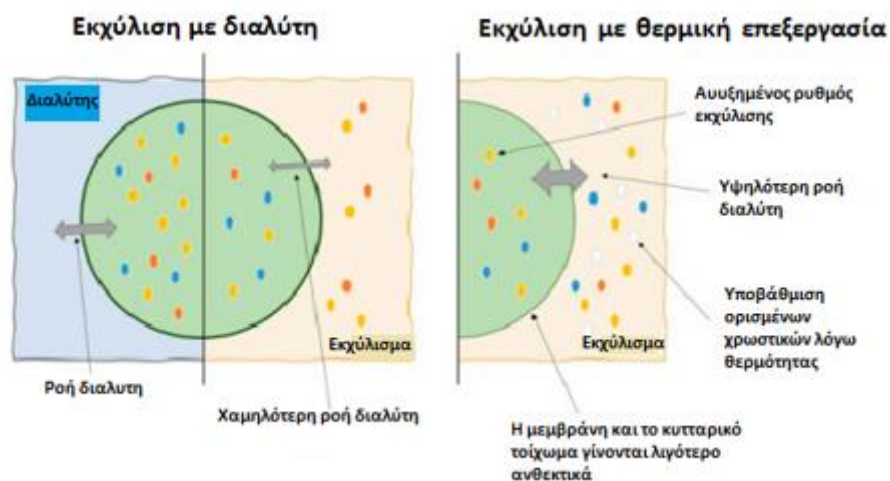
Μεταξύ των μεθόδων που θα εξεταστούν παρακάτω είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε βιομηχανική ειδικά κλίμακα, θα πρέπει να βρεθεί η χρυσή τομή που θα συνδυάζει την μέγιστη αποδοτικότητα της εκχύλισης, το χαμηλό κόστος της διεργασίας καθώς και την εξοικονόμηση της ενέργειας, που συνήθως επιτυγχάνεται με μεθόδους μη θερμικές και φιλικές προς το περιβάλλον.

3.2 Είδη εκχύλισης με μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης

3.2.1 Κλασσική εκχύλιση

Η κλασσική εκχύλιση χρωστικών των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας εκχύλιση διαλύτη που σχετίζεται, ή όχι, με θερμική επεξεργασία, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1. Η διαδικασία εκχύλισης σε διαλύτη συνεπάγεται την ανάμιξη των δύο φάσεων (διαλύτης και βιομάζα), έτσι ώστε η οι προς εκχύλιση ουσίες να μπορέσουν να έρθουν σε επαφή με το διαλύτη, έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Η μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη καθοδηγείται από χημικές συγγένειες. Το διάλυμα που λαμβάνεται στο

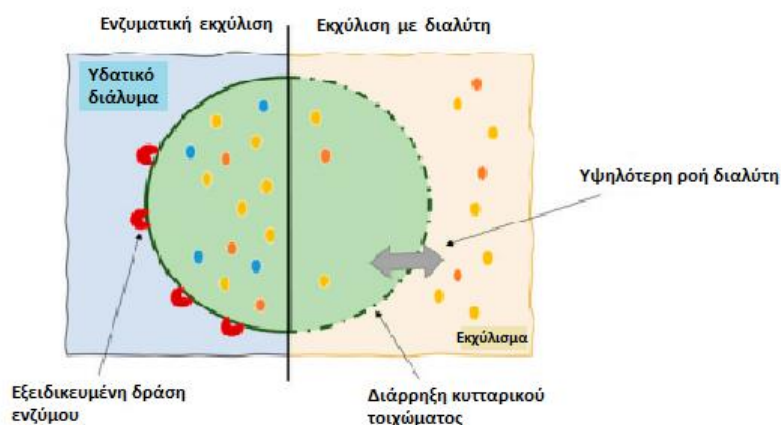
τέλος της διαδικασίας ονομάζεται «εκχύλιση». Το κύριο πλεονέκτημα της κλασσικής εκχύλισης με διαλύτη είναι το μειωμένο κόστος όσον αφορά τις υποδομές και τις διαδικασίες λειτουργίας. Η εκχύλιση με διαλύτη, όμως, απαιτεί συχνά μεγάλους όγκους οργανικών διαλυτών για εκχύλιση καροτενοειδών, ή ακόμη και μεγάλο χρονικό διάστημα επεξεργασίας, λόγω κυκλικής θερμικής επεξεργασίας. Και στις δύο περιπτώσεις, η αποδοτικότητα συνήθως δεν είναι αρκετή για βιομηχανική εφαρμογή. Κατά την επιλογή ενός διαλύτη, η διαλυτότητα της ένωσης, η τοξικότητα και η οικολογική επίδραση των υπολειμμάτων είναι σημαντικά σημεία που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Κατά την εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες ο διαλύτης απορροφάται εντός του κυτταρικού τοιχώματος, προκαλώντας ρήξη της δομής του και καθιστώντας το περιεχόμενο κυττάρων διαθέσιμο για εκχύλιση. Η πλήρης εκχύλιση μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες και συνήθως μπορεί να επιτευχθεί σημαντικά βελτιωμένη απόδοση με ανάδευση ή ανάμιξη. Μόνο σε λίγες περιπτώσεις όπου το μικροφύκος δεν απαιτεί έντονες μεθόδους διάσπασης λόγω της σύνθεσης των κυττάρων μπορεί η εκχύλιση με διαλύτη να είναι εξίσου αποτελεσματική με άλλες μεθόδους. Μια απλή λύση για να αυξηθεί ο ρυθμός και η απόδοση της εκχύλισης είναι να εφαρμοστεί μία θερμική επεξεργασία. Η εκχύλιση των καροτενοειδών μπορεί να γίνει πιο αποδοτική αν η θερμοκρασία κυμανθεί μεταξύ 50 με 65°C. Σε αυτές τις θερμοκρασίες το κυτταρικό τοίχωμα γίνεται λιγότερο ανθεκτικό και η διεργασία της εκχύλισης ενισχύεται με την αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών αυτών στους οργανικούς διαλύτες. Ωστόσο, η μεγάλη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσει οξείδωση και υποβάθμιση των φωτοευαίσθητων καροτενοειδών και των χλωροφυλλών (Pagels et al. 2018; Lichtenthaler 1987)



Εικόνα 3.1 Μηχανισμός εκχύλισης με διαλύτη και εκχύλισης με θερμική επεξεργασία (Pagels et al. 2018)

3.2.2 Ενζυματική εκχύλιση

Η ενζυματική εκχύλιση βασίζεται στη χρήση υδρολυτικών ενζύμων που είναι ικανά να υποβαθμίσουν τη μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, εκθέτοντας τα ενδοκυτταρικά συστατικά τους στον διαλύτη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2**.



Εικόνα 3.2 Μηχανισμός ενζυματικής εκχύλισης (Pagels et al. 2018).

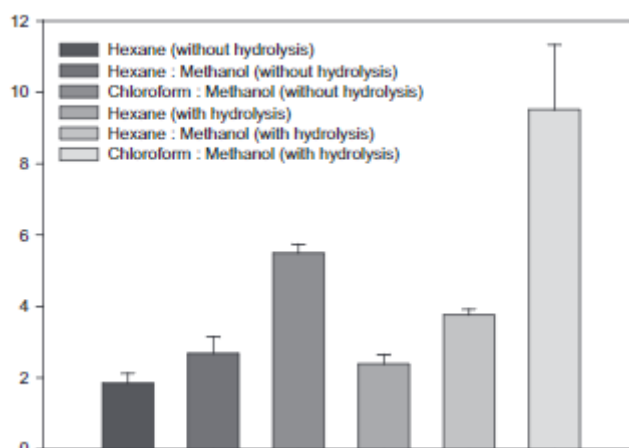
Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης ενζυματικής εκχύλισης είναι η εξειδίκευση των ενζύμων για λύση του κυτταρικού περιβλήματος, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της

κυτταρινάσης, η οποία υδρολύει την κυτταρίνη του τοιχώματος των κυττάρων . Άλλα πλεονεκτήματα είναι οι ήπιες συνθήκες στις οποίες γίνεται το συγκεκριμένο είδος εκχύλισης, όπως το pH και η θερμοκρασία, η απουσία διάβρωσης των ενδοκυτταρικών συστατικών και ο υψηλότερος ρυθμός της διεργασίας. Από την άλλη πλευρά, διάφοροι παράγοντες, εμποδίζουν τη χρήση της ενζυματικής εκχύλισης, όπως το υψηλό κόστος ενζύμων και η ανάγκη εξασφάλισης σταθερών συνθηκών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, δεδομένου ότι τα ένζυμα είναι πολύ ευαίσθητα σε μεταβολές θερμοκρασίας και pH. Επιπλέον, οι ενζυματικές αντιδράσεις μπορεί να διαρκέσουν αρκετές ώρες , γεγονός, που τις καθιστά λιγότερο ελκυστικές για βιομηχανικές εφαρμογές. Οι περισσότερες ενζυματικές εκχυλίσεις στα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια σχετίζονται με την εξαγωγή λιπιδικών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των καρροτενοειδών). Χρησιμοποιούνται συνήθως ως προ-επεξεργασία, με απαραίτητο το μετέπειτα στάδιο της εκχύλισης με διαλύτη (Pagels et al. 2018).

Σε μελέτη των Cho et al, διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα της ενζυματικής υδρόλυσης στην εκχύλιση λιπιδίων από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris*. Η αρχική περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα του *Chlorella vulgaris* ήταν 87.6 mg/g κυττάρου. Τα κυτταρικά τοιχώματα μικροφυκών υδρολύθηκαν από κυτταρίνες και στη συνέχεια τα κλάσματα λιπιδίων τους εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας διάφορους οργανικούς διαλύτες όπως εξάνιο, μεθανόλη και χλωροφόρμιο. Το βέλτιστο pH και θερμοκρασία για την ενζυματική υδρόλυση ήταν pH= 4.8 και T= 50 °C, αντίστοιχα, και η μέγιστη απόδοση υδρόλυσης ήταν 85.3%, η οποία επιτεύχθηκε μετά από 72 ώρες. Μετά την ενζυματική υδρόλυση, η απόδοση εκχύλισης λιπιδίων από τους οργανικούς διαλύτες βελτιώθηκε σε σύγκριση με το ανεπεξέργαστο δείγμα, κατά 1.29 με 1.73 φορές ανάλογα με τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Η συνολική παραγωγικότητα του μεθυλεστέρα λιπαρών οξέων (FAME) μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης ήταν υψηλότερη, κατά 1.10 με 1.69 φορές, και πάλι ανάλογα με τους διαλύτες. Το λιπίδιο που προέκυψε από την εκχύλιση του εν λόγω μικροφύκου, υπέστη ενζυματική υδρόλυση σε διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης, οδηγώντας σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) ίσους με 59.4 mg FAME/g κυττάρου.

Οι αποδόσεις εκχύλισης λιπιδίων από *C. vulgaris* με διάφορους διαλύτες φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Στην εκχύλιση λιπιδίων μετά από ενζυματική υδρόλυση παρατηρήθηκε υψηλότερη απόδοση συγκριτικά με την απουσία αυτής σαν διεργασίας. Η εκχύλιση λιπιδίων μετά από ενζυματική υδρόλυση αυξήθηκε κατά 29.2% με εξάνιο, 40.2% με αναλογία εξανίου: μεθανόλης ίση με 7:3 όγκο κατ' όγκο και 73.1% με αναλογία χλωροφορμίου : μεθανόλης ίση

με 2:1 όγκο κατ' όγκο, συγκρινόμενα με αυτά που δεν υπέστησαν την υδρόλυση. Επειδή η δομή του κυτταρικού τοιχώματος κατέρρευσε μέσω ενζυματικής υδρόλυσης, το λιπίδιο ανακτήθηκε εύκολα (Cho et al. 2013).



Σχήμα 3.1 Ποσοστό ανακτημένων λιπιδίων από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* σε συνθήκες απουσίας αλλά και παρουσίας της διεργασίας της ενζυματικής υδρόλυσης (Cho et al. 2013).

Το υψηλότερο ποσοστό όπως φαίνεται έχει ανακτηθεί σε συνθήκες ενζυματικής υδρόλυσης με την χρήση διαλυτών χλωροφορμίου και μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Cho et al. 2013).

3.2.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, ΗΡΗ (High Pressure Homogenization)

Είναι σημαντικό, προκειμένου να μπορέσει μία μη θερμική μέθοδος διάρρηξης των κυττάρων να εφαρμοστεί ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα, να μπορεί να επεξεργάζεται συνεχώς στερεά υψηλού ιξώδους, να παρουσιάζει υψηλή ενεργειακή απόδοση και σε συνάρτηση με τη μείωση του χρόνου παραμονής να μην καταπονεί την πρώτη ύλη που εισάγεται προς επεξεργασία σε αυτή.

Ειδικότερα, η χρήση της εκχύλισης με βοήθεια του ομογενοποιητή υψηλής πίεσης είναι ευρέως διαδεδομένη για την εξαγωγή χρωστικών από μικροφύκη και κυανοβακτήρια.

Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του ομογενοποιητή η πίεση του αιωρήματος που έχει παρασκευαστεί αυξάνεται περίπου στα 1000 bar, και στη συνέχεια οδηγείται από ένα

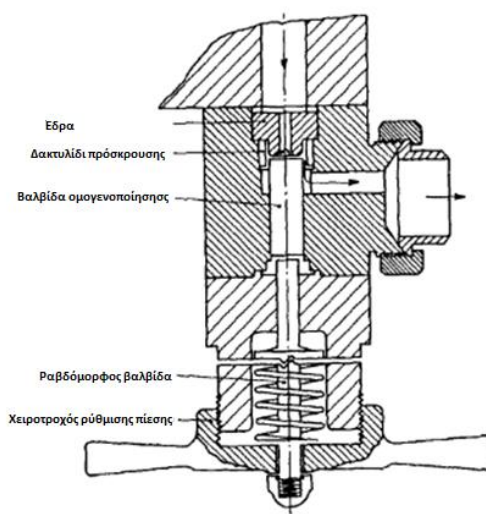
σύστημα βαλβίδων. Στα κύτταρα, τα οποία αλληλεπιδρούν με το ρευστό και με τα στερεά τοιχώματα του συστήματος των βαλβίδων, εφαρμόζονται δυνάμεις.

Στην παρακάτω εικόνα, αναπαρίσταται ένα σύστημα βαλβίδων ενός ομογενοποιητή υψηλής πίεσης, το οποίο αποτελείται από έναν χειροτροχό, με τη βοήθεια του οποίου ρυθμίζεται η πίεση και η θέση της βαλβίδας ομογενοποίησης με την έδρα, μέσω μιας ραβδομόρφου βαλβίδας περιζωμένης από ένα ελατήριο. Στην έξοδο του ρευστού από το άνοιγμα μεταξύ βαλβίδας και έδρας βρίσκεται το δακτυλίδι πρόσκρουσης. (Christi & Moo-Young, 1986).

Γενικά, ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης αποτελείται από μία αντλία θετικής εκτόπισης και μια βαλβίδα ομογενοποίησης. Ο ρόλος της αντλίας είναι η ώθηση του ρευστού στη βαλβίδα ομογενοποίησης, όπου και διαδραματίζεται η διεργασία. Εκεί γίνεται και η ψύξη, για την αποφυγή και τη μείωση των θερμικών αλλοιώσεων, οι οποίες συμβαίνουν λόγω της θερμότητας της τριβής, εξαιτίας της μεγάλης ταχύτητας του ρευστού. Το άνοιγμα από το οποίο εξέρχεται το ρευστό είναι μικρό και βρίσκεται μεταξύ της βαλβίδας και της έδρας αυτής. Τέλος το ρευστό εξάγεται από το μικρό διάκενο και καταλήγει στο δακτυλίδι πρόσκρουσης. Στην έξοδό του, το ρευστό έχει χαμηλή ταχύτητα και πίεση ίση με την ατμοσφαιρική.

Η απαιτούμενη πίεση του ομογενοποιητή εξαρτάται από τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και ποικίλει ανάλογα με το είδος. Έχει αποδειχθεί ότι στο στέλεχος *Chlorella pyrenoidosa*, η πίεση που απαιτείται για τη διάσπαση του 50% των κυττάρων ανά κύκλο είναι περίπου 800 bar.

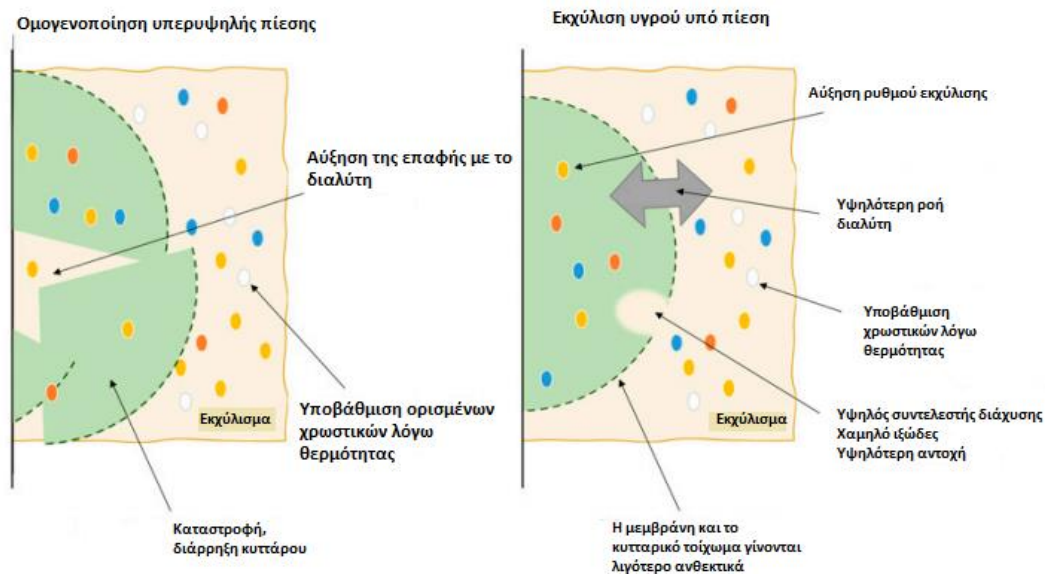
Είναι γνωστό ότι η χρήση του ομογενοποιητή υψηλής πίεσης βοηθάει στην ανάκτηση και παραλαβή ενδοκυτταρικών συστατικών μικροφυκών. Είναι μια μέθοδος με πολλά πλεονεκτήματα, ωστόσο, πολλές φορές μπορεί να προκαλέσει καταστροφή της δομής του κυτταρικού τοιχώματος με επακόλουθο την πλήρη και αναντίστρεπτη διάρρηξη των



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση του βαλβίδων σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Chisti and Moo-Young 1986)

3.2.4 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, PLE (Pressurized Liquid Extraction)

Η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (PLE) είναι μία μέθοδος εκχύλισης η οποία στηρίζεται στην έκθεση του αιωρήματος σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας (50°C έως 100°C) και πίεσης (100 έως 140 bar). Η υψηλή πίεση εμποδίζει το βρασμό του διαλύτη, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία βρασμού. Στην υγρή κατάσταση και με υψηλή θερμοκρασία, ο διαλύτης έχει υψηλό συντελεστή διάχυσης, χαμηλό ιξώδες και υψηλότερη αντοχή σε διαλυτότητα. Ταυτόχρονα, η υψηλή θερμοκρασία μειώνει τη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος, αυξάνοντας τη ροή του διαλύτη στο κύτταρο. Μετά τον χρόνο εκχύλισης, το υγρό αντλείται από τον θάλαμο εκχύλισης με προσθήκη συμπιεσμένου αζώτου και η βιομάζα συγκρατείται από ένα φίλτρο, κάτι που μειώνει τα στάδια της επεξεργασίας. Οι κύριοι περιορισμοί αυτής της μεθόδου, όμως, είναι, αφενός, η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και, αφετέρου, το υψηλό κόστος των εγκαταστάσεων.



Εικόνα 3.4 Σχηματική αναπαράσταση της διάρρηξης με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και της εκχύλισης υγρού υπό πίεση (Pagels et al. 2018).

Επιπλέον, έχει προταθεί μια μέθοδος εκχύλισης με υγρό υπό πίεση, που πραγματοποιείται με τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών (30 έως 70 °C). Το επονομαζόμενο σύστημα εξαγωγής διαλυτών υπό πίεση (CPSE) παρέχει μια φθηνότερη και πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση από το σύστημα PLE που περιγράφεται παραπάνω. Σε αυτό το σύστημα, ο διαλύτης και ο θάλαμος εκχύλισης, που περιέχει τη βιομάζα, θερμαίνονται στην επιθυμητή θερμοκρασία. Ο πεπιεσμένος διαλύτης στη συνέχεια αντλείται μέσω του θαλάμου εκχύλισης, προωθώντας την επαφή μεταξύ του διαλύτη και της βιομάζας και έτσι οδηγεί σε μια πιο αποτελεσματική εκχύλιση. Το σύστημα έχει ως κύρια πλεονεκτήματα τη χρήση ήπιων θερμοκρασιών (θερμοκρασία δωματίου 25°C έως 70 °C) και πιέσεων (70 έως 260 bar), και επιτρέπει επίσης την ανακυκλοφορία του διαλύτη, μειώνοντας έτσι την κατανάλωσή του. Έχει αποδειχθεί ότι οι βέλτιστες συνθήκες για εκχύλιση καροτενοειδών προσδιορίστηκαν να είναι 60°C και 180 bar με 3 κύκλους ανακυκλοφορίας αιθανόλης (Pagels et al. 2018).

Σε μελέτη των Cha et al., πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υγρό υπό πίεση. Συγκεκριμένα, 0.5 g σκόνης του μικροφύκου *Chlorella vulgaris*, εισήχθησαν σε εκχυλιστή επιταχυνόμενου διαλύτη Dionex ASE 200 (Sunnyvale, CA, USA), εξοπλισμένου με κύτταρα από ανοξείδωτο χάλυβα όγκου 33 cm³ και με φιαλίδια συλλογής 60 cm³. Η διαδικασία εκχύλισης ήταν η ακόλουθη: (i) το δείγμα τοποθετήθηκε στο κελί. (ii) το κελί πληρώθηκε με διαλύτη σε πίεση

1500 psi. (iii) εφαρμόστηκε θερμότητα για τον αρχικό χρόνο προθέρμανσης · (iv) πραγματοποιήθηκε στατική εξαγωγή με όλες τις βαλβίδες του συστήματος κλειστές. (v) το κύτταρο ξεπλύθηκε με 60% του όγκου του κυττάρου με διαλύτη εκχύλισης. (vi) ο διαλύτης απομακρύνθηκε από το κύτταρο με αέριο N₂ για 120 δευτερόλεπτα και τέλος (vii) το σύστημα αποσυμπιέστηκε. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, η οποία πληρώθηκε ως τη χαραγή με μεθανόλη, ενώ τέλος πριν από την έγχυση αυτού του δείγματος στο σύστημα HPLC αυτό φιλτραρίστηκε.

Τα αποτελέσματα που έδωσε η μέθοδος PLE στους 160 °C (PLE 160) συγκρίθηκαν με εκείνα της μεθόδου διαβροχής (MAC), της μεθόδου Soxhlet (SOX) και της υποβοηθούμενης με υπερήχους εκχύλισης (HAE), χρησιμοποιώντας 90% αιθανόλη ως διαλύτη εκχύλισης. Η λουτεΐνη, το β καροτένιο, οι χλωροφύλλες α και β και η φαιοφυτίνη α εκχυλίστηκαν με μεγαλύτερη απόδοση στην PLE παρά στις άλλες μεθόδους εκχύλισης. Αν και οι αποδόσεις των HAE και PLE για την ανάκτηση της εκχυλισμένης λουτεΐνης ήταν παρόμοιες, 3.83 και 3.78 mg/g, αντίστοιχα, η PLE ήταν λιγότερο χρονοβόρος. Οι μέγιστες αποδόσεις χλωροφύλλης α και β στη μέθοδο PLE ήταν περίπου 15 mg/g. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι το PLE είναι μια αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης για παραγωγή χλωροφύλλης από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris*, σε σύγκριση με τη MAC (7 mg/g), τη SOX (7 mg/g) και την UAE (9 mg/g), (Kwang et al. 2010) .

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται και στον παρακάτω **Πίνακα 3.1** .

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα ανακτημένων ποσοτήτων καροτενοειδών και χλωροφυλλών εκφρασμένα σε mg/g ύστερα από κυτταρική διάρρηξη με τις μεθόδους : MAC, SOX, UAE και PLE 160 (Kwang et al. 2010).

extraction method ^b	carotenoids (mg/g sample)		chlorophylls (mg/g sample)			
	lutein	β-carotene	chlorophyll a	chlorophyll b	pheophorbide a	pheophytin a
MAC ^c	2.97 ± 0.31	0.08 ± 0.01	4.26 ± 0.53	2.58 ± 0.09	0.85 ± 0.09	2.31 ± 0.17
SOX ^d	3.42 ± 0.11	0.26 ± 0.09	3.32 ± 0.30	3.45 ± 0.28	** 5.15 ± 0.59	* 3.90 ± 0.16
UAE ^e	* 3.83 ± 0.28	0.10 ± 0.02	5.12 ± 0.29	* 3.71 ± 0.41	* 2.15 ± 0.71	2.64 ± 0.94
PLE 160 ^f	** 3.78 ± 0.19	** 0.50 ± 0.25	*** 9.63 ± 0.65	*** 5.77 ± 0.68	*** 0.01 ± 0.00	** 5.64 ± 1.07

^a Values marked with an asterisk are significantly different from MAC as the control method. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.005$, * $P < 0.01$ using Student's *t*-test with $n = 3$. ^b All extractions used 90% ethanol as the extraction solvent. All components were quantified using the corresponding standard. ^c MAC was performed at room temperature for 6 h. ^d SOX was performed using hydrodistillation for 2 h. ^e UAE was performed at room temperature for 2 h. ^f PLE 160 was performed at 160 °C for 30 min.

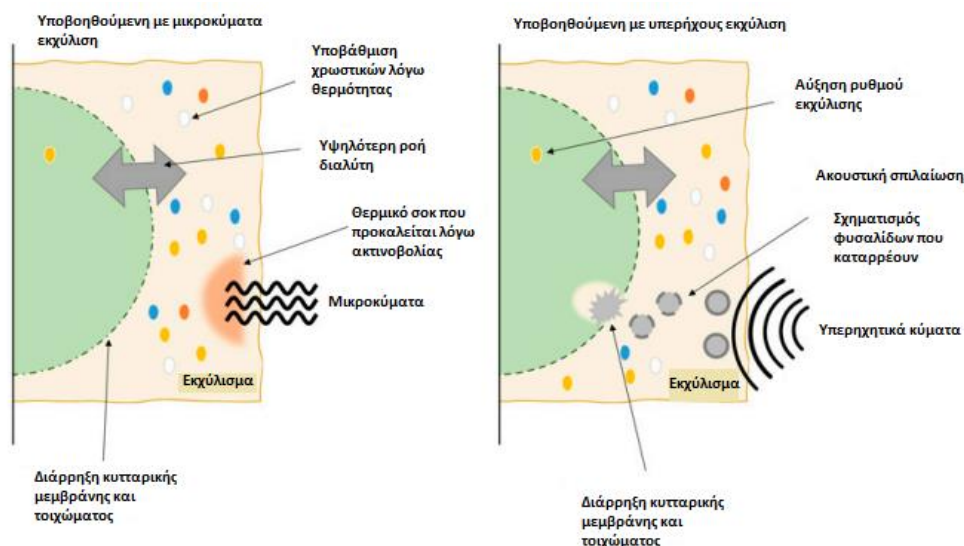
3.2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και υπερήχους

Δύο μέθοδοι εκχυλίσεων με βάση τα κύματα – η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) και από υπερήχους (UAE) - έχουν μελετηθεί και βελτιστοποιηθεί για την εξαγωγή ενώσεων υψηλής αξίας από μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Όσον αφορά την εξαγωγή χρωστικών, έχουν προταθεί και οι δύο μέθοδοι, αν και έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μόνο μελέτες σχετικά με τη βελτιστοποίησή τους.

Η υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση (MAE) βασίζεται στο θερμικό σοκ, που προκαλείται όταν εφαρμόζεται ακτινοβολία στο αιώρημα, προκαλώντας διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Ως θερμική διεργασία, το βασικότερο μειονέκτημα της χρήσης της μεθόδου είναι η περιορισμένη σταθερότητα των χρωστικών ενώσεων λόγω των θερμοκρασιακών αλλοιώσεών τους. Τα κύρια οφέλη της μεθόδου είναι ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης και η χαμηλή κατανάλωση διαλυτών, καθιστώντας τη μια μέθοδο φιλική προς το περιβάλλον. Επιπλέον, λόγω του μικρού χρόνου εκχύλισης, δεν περιορίζεται σε θερμοανθεκτικά μόρια. Επίσης, χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την εκτέλεση της εκχύλισης υπό συνθήκες κενού, αν και αυτή η επιλογή αυξάνει σημαντικά το κόστος της διεργασίας.

Όσον αφορά την υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (UAE), πραγματοποιείται ακουστικής σπηλαιώσης για την παραγωγή φυσαλίδων, που αυξάνουν τοπικά την πίεση όταν καταρρέουν. Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας δημιουργούνται ρωγμές στην επιφάνεια της στερεής μήτρας, λόγω μηχανικής καταπόνησης, αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής στερεού-υγρού. Στο συγκεκριμένο σύστημα, γίνεται διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων. Η διάσπαση αυτή του κυτταρικού τοιχώματος επιτρέπει τη διείσδυση του διαλύτη στο εσωτερικό του κυττάρου και έτσι επιτυγχάνονται υψηλότεροι ρυθμοί εκχύλισης. Η παρούσα μέθοδος ενδείκνυται για εκχύλιση θερμοευαίσθητων ουσιών λόγω της δυνατότητας εφαρμογής της ακόμη και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επιπλέον, έχει μικρότερη διάρκεια από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης και παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση. Η διαδικασία είναι αρκετά απλή και ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι εύκολα διαθέσιμος και με σχετικά χαμηλό κόστος. Επίσης, δεν υπάρχει περιορισμός στη χρήση διαλυτών. Παρόλα αυτά είναι μια διαδικασία δύσκολα αυτοματοποιήσιμη και επαναλήψιμη λόγω του ότι τα λουτρά υπερήχων δεν έχουν μεγάλη ακρίβεια και εύκολα μπορεί να υπάρχει απόκλιση στην ενέργεια που δέχεται το σύστημα. Τέλος, αξίζει να

σημειωθεί ότι μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα περιέχει στερεά, επομένως είναι απαραίτητη η εφαρμογή μίας επιπλέον διαδικασίας διαχωρισμού (Pagels et al. 2018).



Εικόνα 3.5 Σχηματική αναπαράσταση και μηχανισμός εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους (Pagels et al. 2018).

Σύμφωνα με τους Deenu et al, οι αποδόσεις της εκχύλισης λουτεΐνης με υπερήχους με ή χωρίς ενζυματική προεπεξεργασία και της συμβατικής ήταν 3.36, 3.16 και 1.75 mg / g υγρού βάρους του μικροφύκου *Chlorella vulgaris*, αντίστοιχα. Η απόδοση της εκχύλισης λουτεΐνης από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* με τις μεθόδους Soxhlet, με εκχύλιση υγρού υπό πίεση και με υπερκρίσιμο CO₂, ήταν 3.42, 3.78, 0.50 και mg/g ξηρού βάρους του μικροφύκου αντίστοιχα. Η εφαρμογή της μεθόδου της εκχύλισης με υπερήχους αύξησε αυτή την απόδοση σε 9.22 mg/g ξηρού βάρους του μικροφύκου. Επομένως, η εκχύλιση με υπερήχους με ή χωρίς ενζυμική προεπεξεργασία βοήθησε στην αύξηση του ποσοστού της εκχυλιζόμενης λουτεΐνης.

Η ενζυματική προεπεξεργασία στη συγκεκριμένη μέθοδο είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης λουτεΐνης, ακολουθούμενη από την εφαρμογή υπερήχων και συμβατικής εκχύλισης. Σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο, η εκχύλιση με υπερήχους προκαλεί ισχυρή διατάραξη του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο γίνεται το φαινόμενο της σπηλαιώσης, το οποίο έχει περιγραφεί προηγουμένως. Η μέθοδος στο σύνολό της δεν επιδρά καθόλου στη χημική δομή, το χρώμα και την αντιοξειδωτική δράση της λουτεΐνης. Είναι από

τις εναλλακτικές πολλά υποσχόμενες μεθόδους, λόγω και του χαμηλού κόστους εγκατάστασής τους.

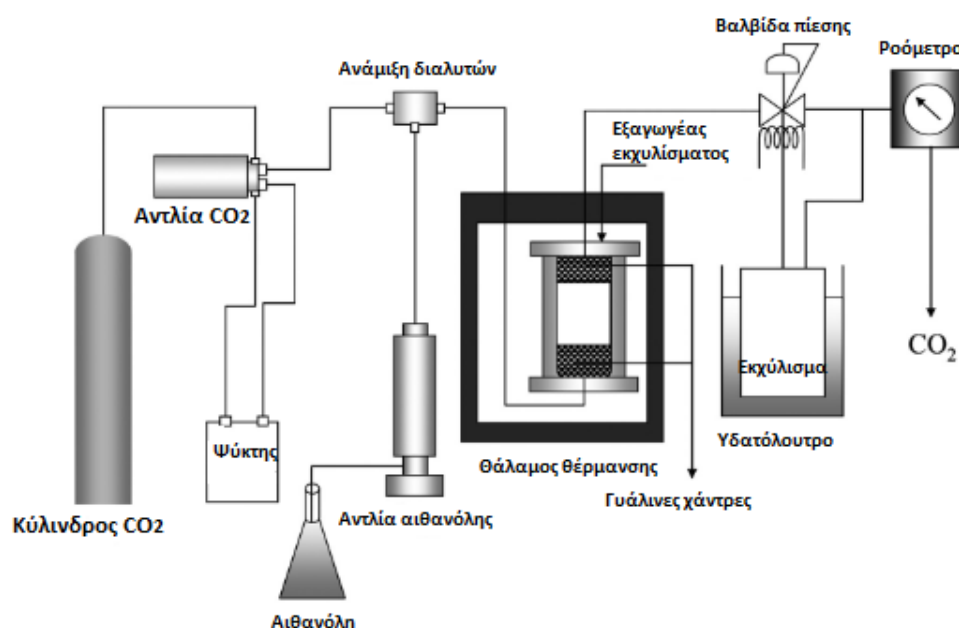
Στον παρακάτω **Πίνακα 3.2**, φαίνεται το περιεχόμενο της ανακτημένης λουτεΐνης ύστερα από εκχύλιση με υπερήχους στους οποίους είχε προηγηθεί ενζυμική προεπεξεργασία ή όχι καθώς και μετά από συμβατική εκχύλιση. Το μέγιστο ποσοστό εμφανίζεται στην πρώτη περίπτωση, όπου η ανακτημένη λουτεΐνη ανέρχεται σε 3.36 g ανά kg ξηρής βιομάζας του προς μελέτη μικροφύκους *Chlorella vulgaris* (Deenu, Naruenartwongsakul, and Kim 2013).

Πίνακας 3.2 Περιεχόμενη λουτεΐνη εκφρασμένη σε g/kg ύστερα από κυτταρική διάρρηξη του μικροφύκους *Chlorella vulgaris* με τις μεθόδους των υπερήχων, των υπερήχων σε συνδυασμό με ενζυματική προεπεξεργασία καθώς και με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης (Deenu, Naruenartwongsakul, and Kim 2013)

Method	Content of lutein (g/kg)
Ultrasound	3.16
Ultrasound with enzymatic pretreatment	3.36
Conventional*	1.75

*Η συμβατική μέθοδος αναφέρεται σε ανάδευση 15 g *Chlorella vulgaris* σε 500 mL 90% αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου για 8 h.

3.2.6 Υπερκρίσιμη εκχύλιση με CO₂



Σχήμα 3.2 Σχηματική αναπαράσταση συστήματος εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂ (Fan et al. 2015).

Από τις τεχνικές που εφαρμόζονται σε μεγάλη κλίμακα, η υπερκρίσιμη εκχύλιση ξεχωρίζει ως μια αποτελεσματική μέθοδος λήψης χρωστικών από μικροφύκη και κυανοβακτήρια, ειδικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες. Η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) βασίζεται στη χρήση ενός υπερκρίσιμου διαλύτη, ο οποίος μπορεί να διεισδύσει στο κύτταρο ενεργώντας σαν αέριο, ενώ επίσης διαλυτοποιεί ενώσεις ενεργώντας σαν υγρός διαλύτης. Λόγω της χαμηλής πολικότητάς του, το υπερκρίσιμο CO₂ είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης σε εκχυλίσεις καροτενοειδών και χλωροφυλλών, λόγω των μη εύφλεκτων και μη τοξικών χαρακτηριστικών του. Αυτή η μέθοδος σχετίζεται με μια πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Γενικά, η υπερκρίσιμη εκχύλιση προτιμάται, καθώς συνδυάζει τις ιδιότητες των υγρών και των αερίων, με τέτοιο τρόπο, ώστε η απόδοση της εκχύλισης να βελτιστοποιείται σε μικρότερο χρόνο, σε σχέση με τους αντίστοιχους οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, στην υπερκρίσιμη κατάσταση η διαλυτότητα αυξάνει ανάλογα με την πυκνότητα, η οποία είναι ανάλογη της πίεσης. Έτσι, η διαλυτότητα μιας ουσίας δεν είναι σταθερή αλλά μπορεί να διαμορφωθεί κατάλληλα, μέσω της ρύθμισης της πίεσης και της θερμοκρασίας, αυξάνοντας έτσι την επιλεκτικότητα της μεθόδου. Άλλα πλεονεκτήματα είναι οι γρηγορότεροι ρυθμοί μεταφοράς μάζας, το χαμηλό ιξώδες και η μεγάλη διαχυτότητα. (Τζίμα Σ. 2020)

Ωστόσο, ο κύριος περιορισμός του SFE εξακολουθεί να είναι το κόστος εφαρμογής και λειτουργίας του. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση μπορεί επίσης να δώσει τη δυνατότητα για σχεδιασμό διεργασιών, που επιτρέπουν περαιτέρω επεξεργασία και εκχύλιση της υπολειπόμενης βιομάζας.

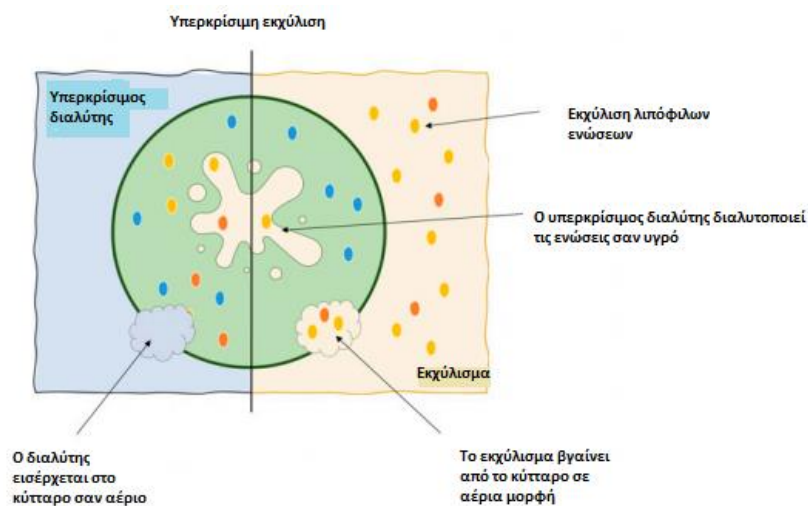
Η διάταξη της μεθόδου αποτελείται από μια αντλία υψηλής πίεσης για CO₂, έναν θάλαμο θέρμανσης, έναν θάλαμο εκχύλισης και έναν θάλαμο συλλογής του εκχυλίσματος. Το CO₂ αντλείται στον θάλαμο θέρμανσης, όπου φτάνει στις υπερκρίσιμες συνθήκες, στη συνέχεια αντλείται στο δοχείο εκχύλισης (εξαγωγέας εκχυλίσματος) και διαχέεται στη βιομάζα. Κατά την εκχύλιση ο διαλύτης διαπερνά τη βιομάζα, προκαλείται διαστολή των κυττάρων και γίνεται ταυτόχρονη διαλυτοποίηση των ενδοκυττάρων ενώσεων. Το εκχύλισμα στη συνέχεια μεταφέρεται στο θάλαμο συλλογής, όπου το CO₂ ψύχεται, συμπιέζεται και ανακυκλώνεται.

Σε μελέτη των Τζίμα Σ. και Μαγουλά Κ., εξετάστηκε η εκχύλιση του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* με χρήση υπερκρίσιμου CO₂, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικών παραμέτρων εκχύλισης (πίεση, θερμοκρασία, παροχή και προκατεργασία δείγματος) στα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται ως προς τα βιοδραστικά τους συστατικά. Οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν η απόδοση της διεργασίας, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους. Επίσης, πραγματοποιήθηκε συμβατική εκχύλιση Soxhlet για να συγκριθεί η απόδοση της διεργασίας και η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων. Εξετάστηκε η απόδοση της εκχύλισης Folch. Τα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella vulgaris*, υπέστησαν προκατεργασία σε υψηλή πίεση για να επιτευχθούν ρήγματα στο κυτταρικό της τοίχωμα και να επιταχυνθούν τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, απεικόνιση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο με σκοπό να διαπιστωθούν ρήξεις στα κυτταρικά τοιχώματα.

Έτσι, βρέθηκε ότι η μέγιστη απόδοση 2.48 %, επιτεύχθηκε σε συνθήκες πίεσης P= 250 bar και σε θερμοκρασία T=60°C, ενώ η ελάχιστη σε πίεση P=110 bar και T=40°C. Ακόμη, βρέθηκε ότι συγκριτικά με την εκχύλιση Soxhlet, η υπερκρίσιμη εκχύλιση οδήγησε σε παραλαβή εκχυλισμάτων πιο πλούσια σε χλωροφύλλες, ενώ δεν εμφάνισαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, λόγω της θερμοκρασίας, η οποία πιθανώς αλλοίωσε μέρος των ανακτώμενων αντιοξειδωτικών ουσιών. Επίσης, μέσω της μοντελοποίησης της υπερκρίσιμης εκχύλισης, διαπιστώθηκε ότι μεγάλο μέρος του ελαίου (πάνω από 90% για συνθήκες πίεσης 180 bar, θερμοκρασίας 50°C και παροχής 2 kg/h) παραμένει παγιδευμένο στο κύτταρο. Συνεπώς, ενισχύεται η αναγκαιότητα εύρεσης πιο αποδοτικής μεθόδου διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος του *Chlorella vulgaris*. (Τζίμα Σ. 2020)

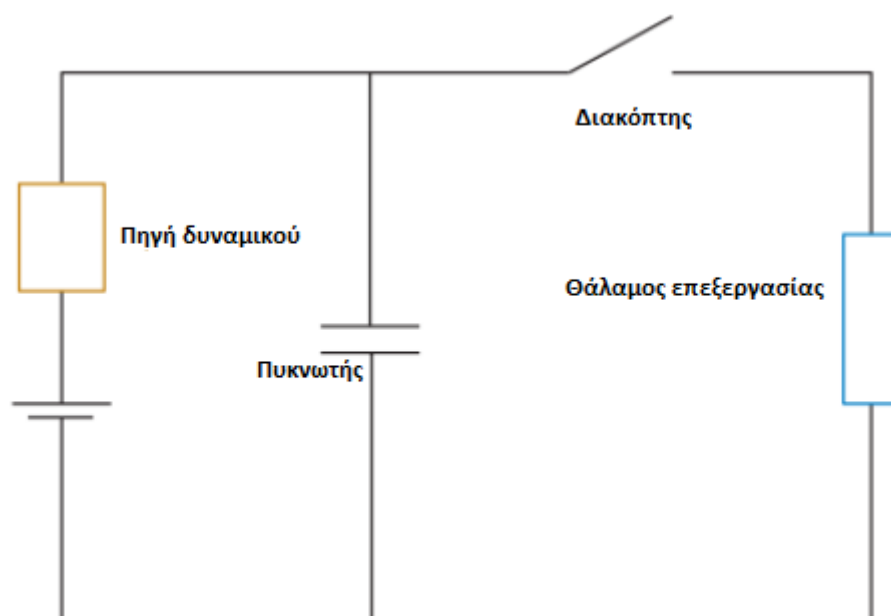
Σε μελέτη των Fan et al., η μέθοδος της υποβοηθούμενης υπερκρίσιμης εκχύλισης με υπερήχους συγκρίθηκε με άλλες μεθόδους, όσον αφορά την απόδοση εκχύλισης λουτεΐνης που περιέχεται στο εκχύλισμα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Επιτυγχάνεται μέγιστη απόδοση εκχύλισης ίση με 124.01 mg λουτεΐνης/100 g ακατέργαστου υλικού υπό βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας εκχύλισης στους 27 ° C, πίεσης εκχύλισης στα 21 MPa, ποσότητας συνδιαλύτη 1.5 mL/g αιθανόλης και ισχύς υπερήχων ίσης με 1000 W. Από την παραπάνω μελέτη βρέθηκε ότι το ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης σε σύγκριση με άλλες μεθόδους αλλά και ανεπεξέργαστα μη διαρρηγμένα κύτταρα δηλαδή του μικροφύκου, αυξήθηκε σχεδόν κατά 2.25 % (Fan et al. 2015).

Η **Εικόνα 3.6** δείχνει μια σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του SFE στο κύτταρο.



Εικόνα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα(Pagels et al. 2018).

3.2.7 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από τη μέθοδο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων

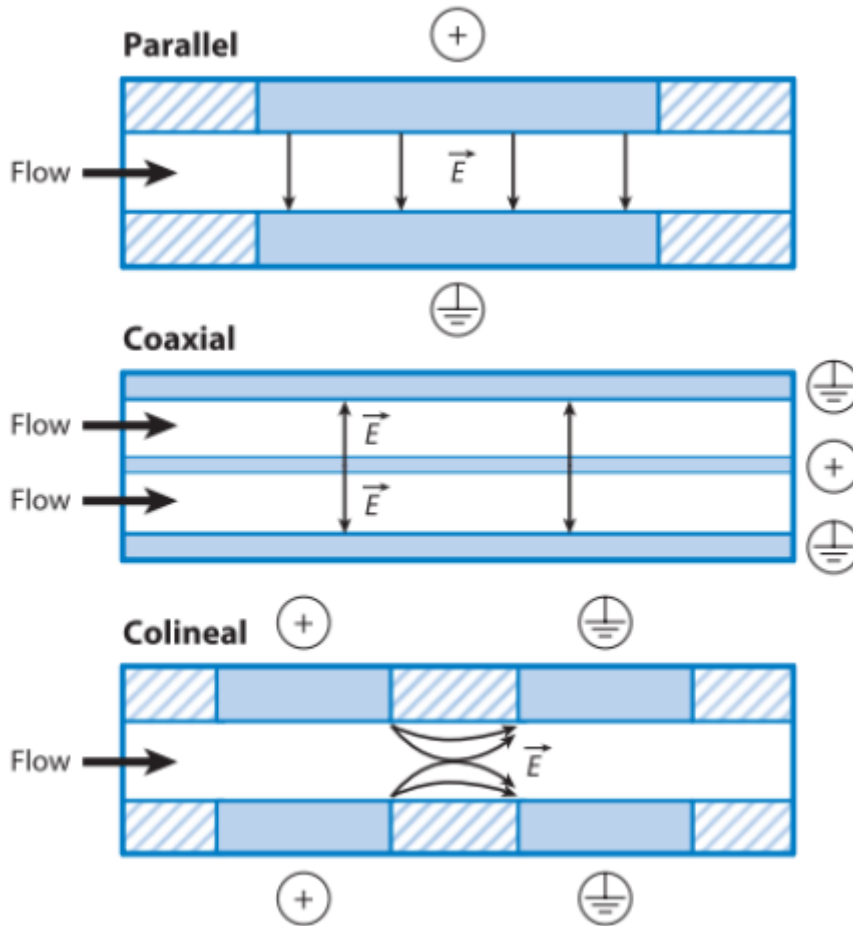


Εικόνα 3.7 Βασικά στοιχεία μιας μονάδας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Puértolas et al. 2012).

Η μέθοδος παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι μία μη θερμική μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης, κατά την οποία ηλεκτρικοί παλμοί υψηλής τάσης και συνεχούς ρεύματος εφαρμόζονται εντός ενός υλικού το οποίο έχει τοποθετηθεί μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Το χρονικό εύρος μεταξύ των παλμών κυμαίνεται μεταξύ τιμών της τάξης των ms και των μs . Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων και από την τάση που παρέχεται στο σύστημα. Πεδία με ένταση ηλεκτρικού πεδίου χαμηλότερη από $0.1 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, θεωρούνται χαμηλής έντασης, μεταξύ $0.1-1 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, χαρακτηρίζονται μέτρια, ενώ για τιμές έντασης μεγαλύτερες του $1 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, ονομάζονται υψηλής έντασης ηλεκτρικά πεδία. Για να αυξηθεί η διαπερατότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων χρειάζεται να εφαρμοστεί σε αυτά πεδίο χαμηλής ή μέτριας έντασης για χρόνους από 100 έως 10.000 μs ή πεδία υψηλής έντασης $1-10 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ για χρόνους μικρότερους των 100 μs .

Τα βασικά μέρη μιας συσκευής παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) είναι η γεννήτρια υψηλής τάσης και ο θάλαμος επεξεργασίας. Η γεννήτρια αποτελείται από έναν φορτιστή που μετατρέπει το εναλλασσόμενο ρεύμα σε συνεχές και φορτίζει μια συσκευή αποθήκευσης ενέργειας, όπως είναι οι πυκνωτές και οι επαγωγείς. Η εκφόρτιση της ηλεκτρικής ενέργειας

στο θάλαμο επεξεργασίας ελέγχεται από ένα διακόπτη, ο οποίος αποτελεί το πιο βασικό μέρος μιας γεννήτριας παλμών βιομηχανικής κλίμακας, επειδή πρέπει να ενεργοποιεί και να απενεργοποιεί ένα κύκλωμα υψηλής τάσης και έντασης ρεύματος μέσα σε ένα κλάσμα μικροδευτερολέπτων. Εάν η τάση στον πυκνωτή δεν είναι υψηλή, χρησιμοποιείται ένας μετασχηματιστής παλμού για να την αυξήσει. Ο θάλαμος επεξεργασίας που περιέχει το προς επεξεργασία υλικό αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια που διαχωρίζονται από ένα μονωτικό υλικό. Σε μελέτες που αποσκοπούν στην κατανόηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ή των παραγόντων που επηρεάζουν το φαινόμενο της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιούνται γενικά θάλαμοι στατικής επεξεργασίας με παράλληλα ηλεκτρόδια. Ωστόσο, πρόσφατα σημειώθηκε σημαντική πρόοδος και στην ανάπτυξη θαλάμων επεξεργασίας συνεχούς ροής για επεξεργασία PEF που είναι απαραίτητες για την αναβάθμιση της τεχνολογίας σε βιομηχανικές εφαρμογές. Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετά διαφορετικά σχέδια θαλάμων επεξεργασίας τα τελευταία χρόνια, οι τρεις πιο σημαντικοί εμπορικοί τύποι θαλάμων επεξεργασίας είναι αυτοί με παράλληλα, με ομοαξονικά και με συγγραμμικά ηλεκτρόδια (Puértolas et al. 2012).

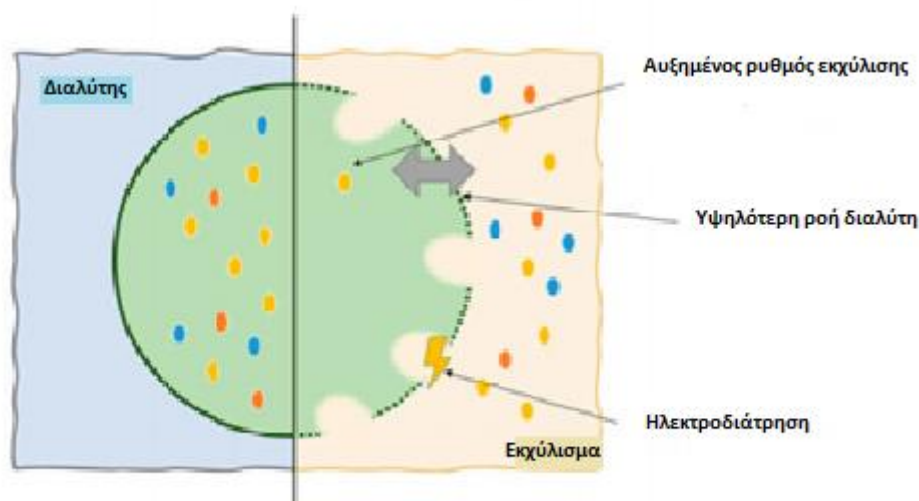


Εικόνα 3.8 Επικρατέστεροι θάλαμοι επεξεργασίας (Puértolas et al. 2012).

Οι βασικές παράμετροι της μεθόδου των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το σχήμα, το πλάτος και ο αριθμός των παλμών, η ειδική ενέργεια και η συχνότητα. Η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων ανάμεσα στα οποία τοποθετείται το προς επεξεργασία υλικό καθώς και η τάση αυξάνουν ή μειώνουν αντίστοιχα την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Όταν τα ηλεκτρόδια του θαλάμου επεξεργασίας είναι παράλληλα, το ηλεκτρικό πεδίο είναι ομοιόμορφα κατανομημένο, ενώ όταν πρόκειται για συγγραμμικά ή ομοαξονικά ηλεκτρόδια το πεδίο αλλάζει ανάλογα με τη θέση.

Όταν εφαρμόζονται εξωτερικά παλμικά ηλεκτρικά πεδία για χρονικά διαστήματα της τάξης των ms ή μ s, η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνεται. Μέσω της ηλεκτροδιάτρησης, της διεργασίας κατά την οποία σχηματίζονται πόροι στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου, διαφορετικά μόρια αποκτούν πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα και εισέρχονται στο κύτταρο. Κατά το φαινόμενο αυτό πέρα από τους πόρους που σταδιακά σχηματίζονται και αλλάζουν σε μέγεθος και αριθμό λόγω της έκθεσης στα ηλεκτρικά πεδία,

παρατηρείται και αύξηση του διαμεμβρανικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι, διαμέσου των πόρων ενδοκυτταρικές ουσίες μπορούν να εξέλθουν από το κύτταρο ή εξωκυτταρικές να εισέλθουν σε αυτό (Puértolas et al. 2012; Pagels et al. 2018).



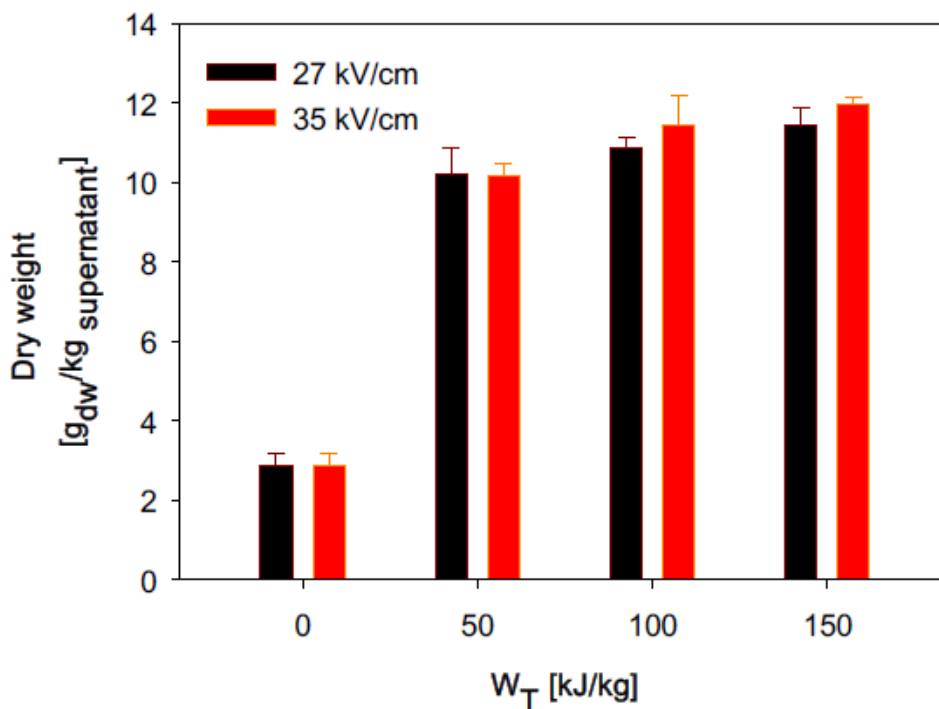
Εικόνα 3.9 Μηχανισμός κυτταρικής διάρρηξης με τη μέθοδο της εφαρμογής των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Pagels et al. 2018).

Σε μελέτη των Scherer et al, διερευνήθηκε το ποσοστό πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν από την προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία αιωρήματος του μικροφύκου *Chlorella vulgaris*. Ανάλογα με τον όγκο και το μέγεθος του δείγματος, το αιώρημα του μικροφύκου, συγκέντρωσης βιομάζας 10 g /L, παλλόταν είτε σε θάλαμο συνεχούς ροής αποτελούμενο από σωλήνες πυριτίου και περισταλτική αντλία (MS-4/12-100 ISMATEC, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Γερμανία) ή σε 500 μ L σε κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης απόστασης 2 mm. (Electroporation Cuvettes Plus, BTX Harvard Apparatus, Holliston MA, USA). Ο θάλαμος συνεχούς ροής είχε όγκο περίπου 500 μ L και περικλειόταν από δύο επίπεδα ηλεκτρόδια με απόσταση μεταξύ τους 2 mm. Ο ρυθμός ροής για τη λειτουργία συνεχούς ροής ορίστηκε σε 3 mL / min και η συχνότητα παλμού ρυθμίστηκε στα 4.5 Hz. Και για τις δύο μεθόδους, οι ορθογώνιοι παλμοί είχαν ένταση πεδίου 40 kV / cm και διάρκεια 1 μ s. Η ειδική ενέργεια επεξεργασίας υπολογίστηκε και βρέθηκε ίση με 150 J/ g . Στις κυψελίδες, στα δείγματα εφαρμόστηκαν 47 παλμοί με συχνότητα αυτών 1 Hz για να μετριάσουν τη θέρμανση. Το αιώρημα του μικροφύκου είχε συνήθως μια αρχική θερμοκρασία 21 ° C και δεν ξεπέρασαν ποτέ τους 38 ° C κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία σε

οποιαδήποτε από τις δύο διαμορφώσεις. Η ισχύς του πεδίου 40 kV / cm και η ειδική ενέργεια 150 J / g χρησιμοποιήθηκαν, επειδή, με βάση εμπειρικά δεδομένα, αυτές οι παράμετροι διασφαλίζουν ότι βασικά όλα τα κύτταρα ηλεκτροδοτούνται.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με PEF υπέστησαν θάνατο, πέρα από κυτταρική διάρρηξη. Σε θερμοκρασίες τόσο πολύ υψηλές όσο και σε πολύ χαμηλές, καθώς και σε συνθήκες αναστολής της δράσης του ενζύμου της πρωτεάσης, πρωτεΐνες απελευθερώθηκαν. Συνεπώς, η μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η απελευθέρωση πρωτεΐνης διευκολύνεται από μια διαδικασία που βασίζεται σε ένζυμα και συμβαίνει μετά τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από PEF σε μια διεργασία στο σύνολό της επιρρεπούς σε ακραίες συνθήκες (Scherer et al. 2019).

Σύμφωνα με τους Pataro et al, η εφαρμογή επεξεργασίας με PEF αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα σε ξηρό βάρος, σε σύγκριση με το δείγμα που δεν υποβλήθηκε σε επεξεργασία. Συγκεκριμένα, μετά από επεξεργασία με PEF σε ισχύ πεδίου 27 ή 35 kV/cm με ενέργεια 50 kJ/kg, η ξηρή ύλη αυξήθηκε 3,6 φορές. Ωστόσο, για ενέργεια μεγαλύτερη από 50 kJ/kg, υψηλότερες τιμές έντασης ηλεκτρικού πεδίου οδήγησαν μόνο σε ελαφρώς υψηλότερη απελευθέρωση περιεχομένου ενδοκυτταρικής ύλης, όπως φαίνεται και στο παρακάτω **Διάγραμμα** (Pataro et al. 2017).



Διάγραμμα 3.1. Περιεκτικότητα ξηρής μάζας στο υπερκείμενο μη επεξεργασμένου (0 kJ/kg) και κατεργασμένου αιωρήματος του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* 1 ώρα μετά την επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία διαφορετικών εντάσεων (Pataro et al. 2017).

Σε άλλη μελέτη των Luengo et al, διερευνήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF) διαφορετικής έντασης στην ηλεκτροδιάτρηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* και στην ανάκτηση καροτενοειδών και χλωροφυλλών. Η χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο πριν και μετά την επεξεργασία με PEF αποκάλυψε την ύπαρξη αναστρέψιμης και μη ηλεκτροδιάτρησης. Η εφαρμογή επεξεργασίας PEF στην περιοχή 20-25 kV/cm προκάλεσε στο μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού του *Chlorella vulgaris* να υποστεί ηλεκτροπληξία αμετάκλητα ακόμη και σε σύντομους χρόνους επεξεργασίας (5 παλμοί των 3 s). Ωστόσο, σε χαμηλότερες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου (10 kV cm⁻¹), παρατηρήθηκαν κυψέλες που υποβλήθηκαν σε αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση ακόμη και μετά από 50 παλμούς των 3 s. Η ηλεκτροπόρωση των κυττάρων *Chlorella vulgaris* με PEF έντασης υψηλότερης από 15 kV/cm και διάρκεια μεγαλύτερη από 15 s αύξησε σημαντικά την απόδοση εκχύλισης ενδοκυτταρικών συστατικών του εν λόγω μικροφύκου. Η εφαρμογή ενός πεδίου 20 kV/cm για 75 s αύξησε την απόδοση εκχύλισης των καροτενοειδών και των χλωροφυλλών α και β

0.5, 0.7 και 0.8 φορές, αντίστοιχα. Ωστόσο, περαιτέρω αυξήσεις της ισχύος του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου επεξεργασίας δεν προκάλεσαν σημαντικές βελτιώσεις στην απόδοση. Η εκχύλιση και ανάκτηση καροτενοειδών από κύτταρα *C. vulgaris* που υποβλήθηκαν σε αγωγή με PEF μετά από 1 ώρα εφαρμογής της επεξεργασίας αύξησε σημαντικά την απόδοση εκχύλισης σε σύγκριση με αυτή που ελήφθη από τα κύτταρα που εκχυλίστηκαν αμέσως μετά το PEF. Μετά από επεξεργασία PEF στα 20 kV/cm για όγκο δείγματος ίσο με 75 λίτρα, η απόδοση εκχύλισης για καροτενοειδή και χλωροφύλλες α και β αυξήθηκε 1.2, 1.6 και 2.1 φορές, αντίστοιχα (Luengo et al. 2014).

Συμπερασματικά, το PEF προτιμάται, καθώς απαιτεί πολύ χαμηλότερη παροχή ενέργειας, μικρότερους χρόνους εκχύλισης και χαμηλότερες ποσότητες διαλύτη από τις κλασικές συμβατικές μεθόδους. Λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, επομένως, βρίσκει συχνότερη εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Ως φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος επεκτείνεται συνεχώς και είναι αποδεκτή και σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς είναι σχετικά μικρή η ποσότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, ενώ σε συνεχή λειτουργία μπορεί να επιτύχει σημαντικά αυξημένες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών σε σχέση με την κλασική εκχύλιση. Επιπλέον, η χρήση οργανικών διαλυτών παραμένει απαραίτητη και οι παράμετροι εκχύλισης όπως ο αριθμός και η διάρκεια του παλμού, καθώς και η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου είναι αναγκαίο να βελτιστοποιηθούν για κάθε μικροφύκος ξεχωριστά.

Οι δυνατότητες της κυτταρικής διάρρηξης με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην εκχύλιση, είναι μεγάλες και η μελέτη πάνω στην βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτής έχει τεράστιο ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Αποτελεί μια μέθοδο μη θερμική, η οποία δεν καταπονεί τα κύτταρα, άρα και τα βιοδραστικά συστατικά που αυτά περιέχουν.

Έτσι, στόχος και της παρούσας διπλωματικής ήταν αρχικά η μελέτη της κινητικής και η μαθηματική μοντελοποίηση της ανάκτησης των χλωροφυλλών και της λουτεΐνης, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ωστόσο, όλα αυτά μελετήθηκαν πάντα σε συνάρτηση με την μείωση του χρόνου κατά τον οποίο ανακτάται το μέγιστο ποσοστό αυτών των χρωστικών, την όσο το δυνατόν πιο χαμηλή θερμοκρασία της εκχύλισης, αλλά και την επίτευξη μιας συνολικής διεργασίας, που εξοικονομεί κόστος και ενέργεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάκτηση φυσικών χρωστικών ουσιών, (χλωροφυλλών και καροτενοειδών με αντιοξειδωτική δράση), από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η κινητική της εκχύλισης των χρωστικών σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 30 ως 60 °C. Ακόμα, εκτός από την επίδραση της θερμοκρασίας στο φαινόμενο αυτό, μελετήθηκε και η επίδραση της περιεκτικότητας αιθανόλης στο διαλύτη της εκχύλισης. Επίσης, στοχεύοντας την βελτίωση της εκχύλισης ως προς την περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, τον χρόνο και την απόδοση της εκχύλισης, μελετήθηκε η επίδραση της προκατεργασίας των κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

Οι χλωροφύλλες που ανακτήθηκαν ήταν οι χλωροφύλλες α και β, ενώ όσον αφορά τα καροτενοειδή, η μελέτη επικεντρώθηκε στο πιο βασικό από αυτά, τη λουτεΐνη. Οι βιοδραστικές αυτές ουσίες, εκτός από την εφαρμογή τους στον κλάδο των τροφίμων ως φυσικές χρωστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αντιοξειδωτικά.

Σε έντονη αντιοξειδωτική δράση, οδηγούν, όπως προαναφέρθηκε και στην **Παράγραφο 2.2.5**, οι φαινολικές ενώσεις και τα φαινολικά οξέα. Αν και η ξηρή βιομάζα, του εν λόγω μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, εξετάστηκε στην αρχή του σχεδιασμού της πειραματικής διαδικασίας, ως προς το περιεχόμενό της σε φαινολικές ενώσεις, βρέθηκε, βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, ότι δεν χαρακτηρίζεται από σημαντική ποσότητα αυτών. Έτσι, η μελέτη επικεντρώθηκε στην αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδίδει στο εκχύλισμα η λουτεΐνη.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

4.2 Παρασκευή αιωρήματος κυττάρων μικροφύκου *Chlorella Pyrenoidosa* 5% w/w

Για τη διεξαγωγή της μελέτης, παρασκευάστηκε αιώρημα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* 5% w/w, με τη διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω. Στην παρούσα εργασία

χρησιμοποιήθηκε ξηρή σκόνη μικροφύκου *C. Pyrenoidosa* (Z- Company BV, NATURAL & HEALTHY, Nuenen, The Netherlands).

Σε κωνική φιάλη των 500 mL, προστέθηκαν 380 mL απιονισμένου νερού θερμοκρασίας δωματίου και στη συνέχεια σταδιακά και υπό συνεχή ανάδευση προστέθηκαν 20 g της σκόνης του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Επομένως η σταθμική αναλογία ήταν $\frac{\text{ξηρό μικροφύκος}}{\text{απιονισμένο νερό}} = \frac{1}{20}$. Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάστηκε το αιώρημα 5 % w/w, το οποίο αφέθηκε υπό έντονη ανάδευση για 20 min, χωρίς πωματισμό του στομίου της κωνικής φιάλης, ώστε τα κύτταρα να ενυδατωθούν πλήρως.

4.3 Επεξεργασία αιωρήματος

Ένα μέρος του αιωρήματος δεν υπέστη επεξεργασία. Ωστόσο, στο υπόλοιπο μέρος εφαρμόστηκαν μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης, με σκοπό να αυξηθεί η διαπερατότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση ο ρυθμός και η απόδοση της εκχύλισης αυτών. Οι μέθοδοι αυτές ήταν η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

4.3.1 Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης

Μια ποσότητα του αιωρήματος του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* 5% w/w, υπέστη επεξεργασία σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Invensys APV-1000, London, UK) στα 800 bar. Το αιώρημα διήλθε 10 φορές από τον ομογενοποιητή, ώστε τα κύτταρα να διαρρηχθούν στο μέγιστο βαθμό. Το επεξεργασμένο δείγμα υποβλήθηκε σε ξήρανση υπό κατάψυξη και στη συνέχεια φυλάχθηκε εντός ξηραντήρα προκειμένου να υποστεί εκχύλιση για τη μέτρηση των ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών αυτού. Όπως προκύπτει και από προηγούμενα πειράματα που έχουν διεξαχθεί κατά καιρούς στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, βρέθηκε ότι επεξεργασία των κυττάρων με αυτή τη μέθοδο, επιφέρει το μέγιστο βαθμό κυτταρικής διάρρηξης.



Εικόνα 4.1 Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης SPX APV 1000

4.3.2 Παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Μια ποσότητα αιωρήματος μικροφύκους *Chlorella pyrenoidosa* 5% w/w επεξεργάστηκε με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Οι επεξεργασίες έγιναν με την χρήση εντός θαλάμου παράλληλων ηλεκτροδίων, ο οποίος τοποθετήθηκε εντός του θαλάμου επεξεργασίας διαλείποντος έργου. Τα ηλεκτρόδια του θαλάμου είχαν σχήμα πλάκας, με επιφάνεια 10 cm², ενώ η μεταξύ τους απόσταση ήταν 2 cm. Από τα 400 mL που είχαν παρασκευαστεί στην αρχή τα 200 mL υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με PEF. 15 mL αιωρήματος μεταφέρθηκαν με σιφόνι στον θάλαμο επεξεργασίας. Στο αιώρημα, εντός του θαλάμου επεξεργασίας, εφαρμόστηκαν παλμοί σταθερού εύρους 15 μs με την χρήση του συστήματος ELCRACK[®] HVP-5 PEF (DIL, Quackenbrück, Germany).

Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, οι οποίες διέφεραν ως προς τον αριθμό των παλμών που δέχτηκε το εκάστοτε δείγμα (300, 600 και 1000 παλμοί). Η θερμοκρασία εισόδου όλων των δειγμάτων ήταν 25°C, ενώ η θερμοκρασία εξόδου τους, στο σημείο συλλογής, δεν ξεπέρασε τους 50°C. Οι τρεις συνθήκες επεξεργασίας που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική μελέτη συνοψίζονται στον

Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1 Συνθήκες επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Κωδικοποίηση επεξεργασίας	Ένταση ηλεκτρικού πεδίου (kV/cm)	Συχνότητα παλμών (Hz)	Αριθμός Παλμών	Ειδική ενέργεια (kJ/kg)
PEF 300	4.7	20	300	76.0
PEF 600	4.2	20	600	138.7
PEF 1000	4.0	20	1000	220.0

Η ειδική ενέργεια κάθε επεξεργασίας υπολογίστηκε με την χρήση της σχέσης :

$$W' = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} I(t)V(t)dt \quad (4.1)$$

Όπου I η ένταση του ρεύματος σε A, V η εφαρμοζόμενη τάση σε V, t η διάρκεια του παλμού σε s και m η μάζα του επεξεργαζόμενου δείγματος σε kg. Η ολική ειδική ενέργεια (W) προέκυψε από τον πολλαπλασιασμό της ενέργειας ανά παλμό (W') με τον αριθμό των παλμών (Raso, Alvarez, Condon, & Sala Trepal, 2000).



Εικόνα 4.2 Μονάδα παλμικών ηλεκτρικών πεδίων Elcrack-5kW, DIL

4.4 Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικών χλωροφυλλών και καρροτενοειδών της πρώτης ύλης

Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε χλωροφύλλες και καρροτενοειδή ανεπεξέργαστο αιώρημα υπέστη επεξεργασία με ομογενοποιητή υψηλής πίεσης. Η πίεση ήταν ρυθμισμένη στα 800 bar και το δείγμα διήλθε 10 φορές. Στη συνέχεια, ύστερα από ξήρανση υπό κατάψυξη, περίπου 125 mg ξηρού αιωρήματος (ΗΠΗ 800/10) ενυδατώθηκαν με 500 mL H₂O και προστέθηκαν 4.5 mL ακετόνης. Ακολούθησε ανάδευση για 30 min και τα δείγματα εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν στα 6500 g για 10 min. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές εκπλύσεις των ιζημάτων με 5 mL ακετόνης, σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία. Τα εκχυλίσματα, αφού συλλέχθηκαν και αραιώθηκαν με ακετόνη σε τελικό όγκο 25 mL, φωτομετρήθηκαν στα 470, 649 και 664 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis HitachiU 2900. Ο υπολογισμός των ολικών χλωροφυλλών και καρροτενοειδών πραγματοποιήθηκε βάσει των παρακάτω μαθηματικών σχέσεων (Lichtenthaler 1987).

$$C_{a+\beta} = 5.24 \cdot A_{664} + 22.24 \cdot A_{649} \quad (4.2)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 2.13 \cdot C_a - 97.64 \cdot C_b}{209} \quad (4.3)$$

Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ποσοστά ανακτημένων χλωροφυλλών και καρροτενοειδών με τη βοήθεια των παρακάτω εξισώσεων :

$$\% C_{a+\beta} = \frac{(5.24 \cdot A_{664} + 22.24 \cdot A_{649}) \cdot dil \cdot \frac{V}{m} \cdot 100\%}{C_{a+\beta_tot}} \quad (4.4), \text{ όπου}$$

A_{664} : η απορρόφηση στα 664 nm

A_{649} : η απορρόφηση στα 649 nm

dil : ο παράγοντας αραιώσης του προς φωτομέτρηση δείγματος

V : ο όγκος του δείγματος

m : η μάζα ξηρής βιομάζας

και $C_{a+\beta}$: οι ολικές χλωροφύλλες όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο ΗΠΗ (Lichtenthaler 1987)

4.5 Εκχύλιση χλωροφυλλών και λουτεΐνης

Για να προσδιοριστεί τώρα, η ποσότητα των χλωροφυλλών α και β και της λουτεΐνης στο εκχύλισμα, το ανεπεξέργαστο αιώρημα υπέστη επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από τρία πειράματα σε τρεις θερμοκρασίες, τρεις περιεκτικότητες σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης και τρεις διαφορετικές συνθήκες παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, όπως περιγράφονται στον **Πίνακα 4.1**. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι θερμοκρασίες εκχύλισης 30, 45 και 60°C και η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη 95, 85 και 75% w/v. Το επεξεργασμένο και μη αιώρημα αφού φυγοκεντρήθηκε, επαναδιαλύθηκε στον κατάλληλο κάθε φορά διαλύτη και έγινε μετάγγιση αυτού σε γυάλινα σφραγισμένα δοχεία. Κάθε δοχείο τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας. Η εκχύλιση αυτών διήρκεσε έως και 6 ώρες υπό σταθερή ανάδευση στα 170 rpm.

4.5.1 Προσδιορισμός ανακτημένων χλωροφυλλών

Συγκεκριμένα για τις χλωροφύλλες, ύστερα από τη συλλογή του δείγματος των διαρρηγμένων κυττάρων ακολούθησε λήψη 25 mL επεξεργασμένου αιωρήματος, φυγοκέντρηση στα 6500 g για 5 min, αναδιάλυση των ιζημάτων στο διαλύτη της εκχύλισης και εκχύλιση στο υδατόλουτρο στους 30 °C, στους 45 °C και στους 60 °C των επιμέρους επεξεργασμένων δειγμάτων. Το ίδιο έγινε και για το ανεπεξέργαστο δείγμα με κωδικοποίηση Control. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές ώστε να προκύψουν τα πειραματικά σφάλματα των μετρήσεων. Η λήψη 2,5 mL των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανά μία ώρα, έως και 6 ώρες και ακολουθούσε φυγοκέντρηση αυτών στα 6500 g για 10 min στους 20°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό συλλεγόταν, αραιωνόταν κατάλληλα κάθε φορά σε αιθανόλη και τέλος με χρήση φωτομέτρου στα 470, 649 και 664 nm Πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών σύμφωνα με τις **Εξισώσεις 4.2** και **4.4**.

4.5.2 Προσδιορισμός ανακτημένης λουτεΐνης

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της ανακτημένης λουτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε η ενόργανη μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μια στήλη αντίστροφης φάσης NUCLEOSIL 300-5C18 (25 × 0.46 cm, με 5 μm μέγεθος σωματιδίων). Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 25 ° C. Οι χρωστικές εκλούστηκαν ισοκρατικά χρησιμοποιώντας ακετονιτρίλιο-νερό-μεθανόλη, σε αναλογία 65%:2%:23%, ως κινητή φάση για 25 λεπτά. Ο ρυθμός ροής μέσω της στήλης ήταν 0.7 mL/min και ο όγκος του δείγματος 20 μL. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με χρήση ανιχνευτή με συστοιχία διόδων (DAD) στα 443 nm (Luengo,2015). Ο υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης της λουτεΐνης ως προς την ολική περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε λουτεΐνη πραγματοποιήθηκε με την χρήση της παρακάτω σχέσης (Luengo et al. 2015):

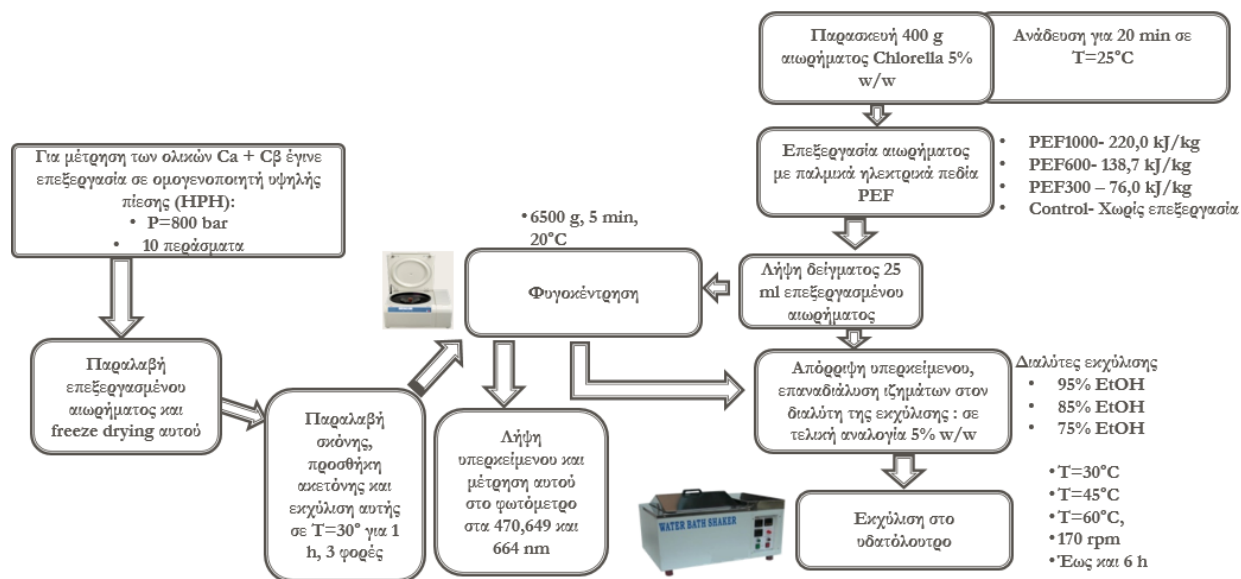
$$\frac{A \cdot V}{lut \cdot m} \cdot 100 \quad (4.5), \text{ όπου}$$

A: το εμβαδόν της πρώτης κορυφής που προκύπτει στα χρωματογραφήματα που παραλήφθησαν από την υγρή χρωματογραφία σε μήκος 443 nm.

V: ο όγκος του δείγματος

lut = το εμβαδό που αντιστοιχεί στην ολική περιεκτικότητα λουτεΐνης της βιομάζας ανά μονάδα μάζας αυτής.

m: η μάζα της ξηρής βιομάζας (Luengo,2015)



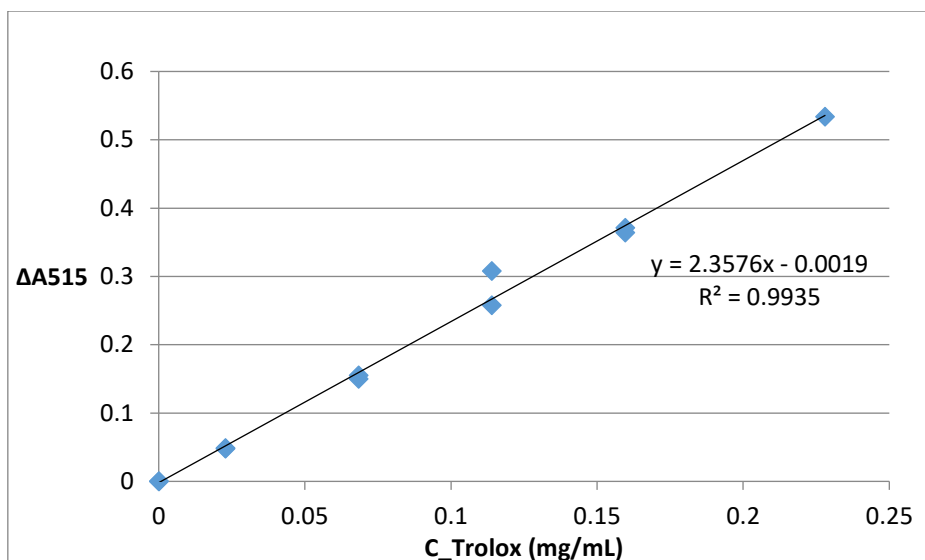
Διάγραμμα 4.1 Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

4.5.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

Με τη βοήθεια της μεθόδου DPPH πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των ανακτημένων αντιοξειδωτικών ουσιών στελέχους *Chlorella pyrenoidosa* εκφρασμένα σε ισοδύναμα Trolox.

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH, ζυγίστηκαν 2.5 mg DPPH με την βοήθεια αναλυτικού ζυγού. Η ποσότητα αυτή μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml στην οποία μεταφέρθηκε μεθανόλη περίπου μέχρι τη μέση της «φούσκας». Η φιάλη πωματίστηκε και αναδεύτηκε ισχυρά. Αφού εξακριβώθηκε πως δεν υπήρχαν αδιάλυτοι κόκκοι DPPH η φιάλη πληρώθηκε με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρθηκαν 3.9 mL διαλύματος DPPH και 0.1 κατάλληλα αραιωμένου δείγματος. Με τον ίδιο τρόπο, παρασκευάστηκε και ένα τυφλό διάλυμα που αντί για δείγμα περιείχε 0.1 mL από το διαλύτη του δείγματος. Τα δείγματα αφέθηκαν να αντιδράσουν για 60 min απουσία φωτός. Ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησής τους στα 515 nm, με τη χρήση φωτόμετρου, του οποίου ο μηδενισμός έγινε με καθαρή μεθανόλη.

Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής δράσης προέκυψε από την διαφορά της απορρόφησης κάθε δείγματος από την απορρόφηση του τυφλού ($\Delta A = A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}$), και την χρήση της καμπύλης αναφοράς, η οποία συσχετίζει την διαφορά αυτή με ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Luengo et al. 2015)



Διάγραμμα 4.2 Καμπύλη αναφοράς για συσχέτιση της απορρόφησης του φωτομέτρου με τα ισοδύναμα trolox προκειμένου να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική δράση.

4.5.4 Προσδιορισμός ξηρού βάρους των εκχυλισμάτων

Σε προζυγισμένα δοχεία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της μάζας των εκχυλισμάτων για χρόνους εκχύλισης 0, 1, 3 και 6 h, για κάθε συνθήκη εκχύλισης. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν στους 100°C όπου και παρέμειναν για 24 h ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του διαλύτη. Αφού μετρήθηκαν και πάλι στον αναλυτικό ζυγό, υπολογίστηκε το ξηρό βάρος του εκάστοτε εκχυλίσματος.

4.6 Μαθηματική μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων

4.6.1 Χλωροφύλλες

Η μελέτη της κινητικής του φαινομένου της εκχύλισης των χλωροφυλλών έγινε με τη βοήθεια του μαθηματικού μοντέλου:

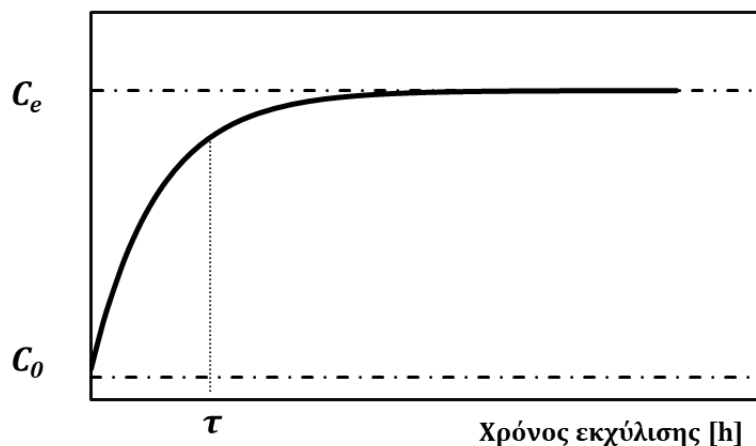
$$C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.6), \text{ όπου}$$

C_e : το τελικό ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών εκφρασμένο ως προς τις ολικές χλωροφύλλες της πρώτης ύλης για χρόνο $t \rightarrow \infty$.

C_0 : το ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών εκφρασμένο ως προς τις ολικές χλωροφύλλες της πρώτης ύλης για χρόνο $t=0$.

τ : ο χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης κατά τον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3 % του φαινομένου της εκχύλισης σε h.

t : ο χρόνος εκχύλισης εκφρασμένος σε h

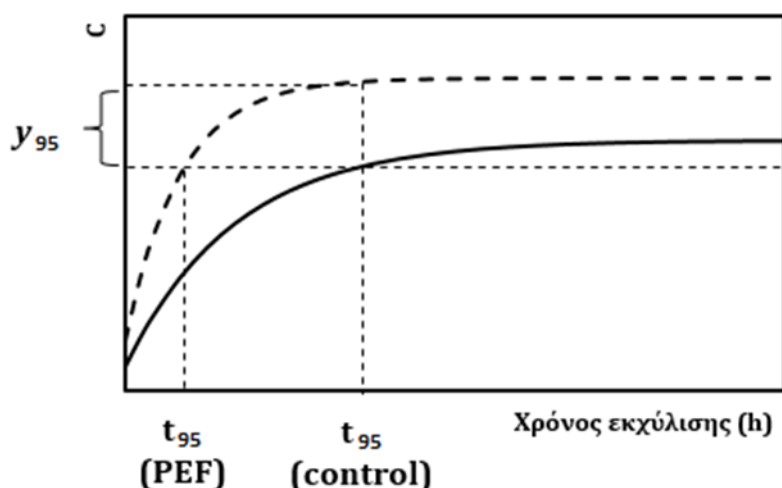


Διάγραμμα 4.3 Καμπύλη ποσοστού ανακτημένων χλωροφυλλών συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης

Το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε, γιατί έδινε ικανοποιητικές προσαρμογές στην μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων, ερμηνεύοντας την εξέλιξη της εκχύλισης των χλωροφυλλών, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Η παράμετρος C_e προσφέρει μια ικανοποιητική εικόνα για την απόδοση της εκχύλισης και τον χρόνο ολοκλήρωσης της διεργασίας, καθώς από αυτήν απορρέουν πληροφορίες για την σύγκριση των διαφορετικών επεξεργασιών τόσο ως προς την απόδοση όσο και ως προς τον χρόνο ολοκλήρωσης του φαινομένου, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την σύγκριση του χρόνου ολοκλήρωσης της εκχύλισης από τα επεξεργασμένα δείγματα σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα, μελετήθηκε η παράμετρος t_{95} , η τιμή της οποίας αντιστοιχεί στο χρόνο στον οποίο επιτυγχάνεται το 95% του C_e των ανεπεξέργαστων κυττάρων για δεδομένες τιμές θερμοκρασίας και περιεκτικότητας αιθανόλης του διαλύτη.

$$t_{95} = -\tau \cdot \ln \left(\frac{0.95 \cdot C_e - C_0}{C_e - C_0} \right) \quad (4.7)$$



Διάγραμμα 4.4: Καμπύλη $0.95 C_e$ συναρτήσεως του χρόνου εκχύλισης.

4.6.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Η ολική ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, εκφράστηκε σε ισοδύναμα trolox ($\frac{mg\ trolox}{g\ ξηρής\ βιομάζας}$) και μοντελοποιήθηκε μαθηματικά μέσω της εξίσωσης

$$TEAC = TEAC_e - (TEAC_e - TEAC_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{TEAC}}} \quad (4.8), \text{ όπου}$$

$TEAC_e$: η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα trolox ($\frac{mg\ trolox}{g\ ξηρής\ βιομάζας}$), για χρόνο $t \rightarrow \infty$.

$TEAC_0$: η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα trolox ($\frac{mg\ trolox}{g\ ξηρής\ βιομάζας}$), για χρόνο $t=0$.

τ_{TEAC} : ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

t : ο χρόνος εκχύλισης εκφρασμένος σε h

4.6.3 Εξίσωση Arrhenius

Για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας της εκχύλισης στα τελικά ποσοστά ανάκτησης των χλωροφυλλών, εφαρμόστηκε η εξίσωση του Arrhenius στην παράμετρο K .

$$\ln K = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + \ln K_{ref} \quad (4.9)$$

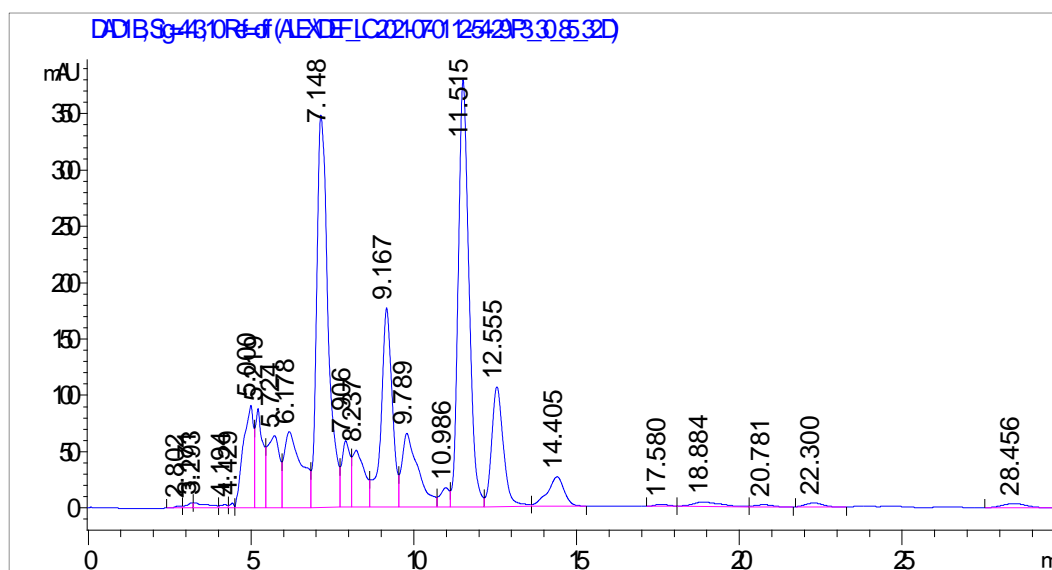
και σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα ακολουθώντας τη γραμμική τάση.

Στην δική μας περίπτωση το K αναφέρεται στην παράμετρο C_e , ή στην $TEAC_e$, στην τελική συγκέντρωση δηλαδή των χλωροφυλλών και στην τελική αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος αντίστοιχα, T είναι η θερμοκρασία της εκχύλισης, T_{ref} είναι η θερμοκρασία αναφοράς και E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης. Η τελευταία δείχνει κατά πόσο ευνοείται το φαινόμενο της εκχύλισης από τη θερμοκρασία.

Αναφορικά με τη συσχέτιση της τελικής συγκέντρωσης σε χλωροφύλλες και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με την περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε η γραμμική προσαρμογή του μοντέλου που προαναφέρθηκε.

4.6.4 Επιλεκτικότητα της εκχύλισης

Ενδεικτικά, παρατίθεται ένα χρωματογράφημα στο οποίο βλέπουμε ότι πρώτη σε σειρά εκλούεται η λουτεΐνη, η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στην χλωροφύλλη β και η τρίτη στην α.



Διάγραμμα 4.5: Χρωματογράφημα που παραλήφθηκε από την HPLC, όπου φαίνονται οι 3 κορυφές κατά σειρά της λουτεΐνης, της Ca και Cβ.

Για την ερμηνεία της επιλεκτικότητας της απελευθέρωσης αυτών των ουσιών υπολογίστηκαν οι λόγοι των εμβαδών: $\frac{C_{\alpha}}{C_{\beta}}$ και $\frac{lut}{C_{\alpha}+C_{\beta}}$. Με τη μεταβολή του λόγου αυτού των εμβαδών στις επιμέρους συνθήκες, εξετάστηκε η επιλεκτικότητα της εκχύλισης πρώτα ως προς τις χλωροφύλλες μεταξύ τους και έπειτα ως προς τις χλωροφύλλες έναντι της λουτεΐνης.

4.7 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Επιπλέον, εφαρμόζεται ο έλεγχος Duncan ($p=0.05$) για να αποτιμηθούν, για κάθε παράγοντα ξεχωριστά, οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των εναλλακτικών περιπτώσεων. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19, SPSS Inc., IBM Company, Release 19.0.0).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αποτελέσματα και
σχολιασμός

5.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την μελέτη της ανάκτησης χλωροφυλλών και καροτενοειδών από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*. Αρχικά, σχολιάζεται η ολική περιεκτικότητα του μικροφύκου σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Έπειτα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μαθηματικής μοντελοποίησης των ποσοστών των ανακτημένων χλωροφυλλών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, συναρτήσεως του χρόνου εκχύλισης, μέσω της **Εξίσωσης 4.6**. Η επίδραση της θερμοκρασίας της εκχύλισης στα μέγιστα ποσοστά ανακτημένων συστατικών μελετήθηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης Arrhenius (**Εξίσωση 4.9**), από την οποία υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης για κάθε περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης, σε κάθε συνθήκη επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, καθώς και στο ανεπεξέργαστο κυτταρικό υλικό (PEF 300, PEF 600, PEF 1000 και CONTROL). Ακόμα, σχολιάζεται ο χρόνος κατά τον οποίο επιτυγχάνεται το 95% του τελικού ποσοστού ανάκτησης από το ανεπεξέργαστο δείγμα για δεδομένη θερμοκρασία και διαλύτη, συγκριτικά με κάθε συνθήκη επεξεργασίας, ώστε να σχολιαστεί η επιτυχία ίδιας απόδοσης της εκχύλισης αλλά σε μικρότερο χρόνο, με την χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Επίσης, εξετάζεται η επίδραση τόσο της θερμοκρασίας και του χρόνου, όσο και της αιθανόλης του διαλύτη στην ανάκτηση της λουτεΐνης ως βασικό καροτενοειδές. Επιπροσθέτως σχολιάζεται η εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Τέλος, αναφέρεται η επίδραση των παραμέτρων στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων και δεδομένων όλων των παραπάνω προτείνεται ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την ανάκτηση των μελετημένων βιοδραστικών συστατικών.

5.2 Προσδιορισμός ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών

Η ξηρή βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιείχε τόσο χλωροφύλλες α και β όσο και καροτενοειδή. Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα της βιομάζας σε αυτά τα συστατικά έγινε χρήση της τεχνολογίας της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης όπως προαναφέρθηκε και στο **Κεφάλαιο 4**.

Συγκεκριμένα, κατά μέσο όρο περιείχε 18.45 ± 0.89 mg χλωροφυλλών / g ξηρής βιομάζας και 1.22 ± 0.08 mg καροτενοειδών / g ξηρής βιομάζας.

5.2.1 Μαθηματική μοντελοποίηση της ανάκτησης των χλωροφυλλών

Προκειμένου να μελετηθεί η κινητική της ανάκτησης των χλωροφυλλών, έγινε χρήση του παρακάτω μοντέλου (Εξίσωση 4.6) :

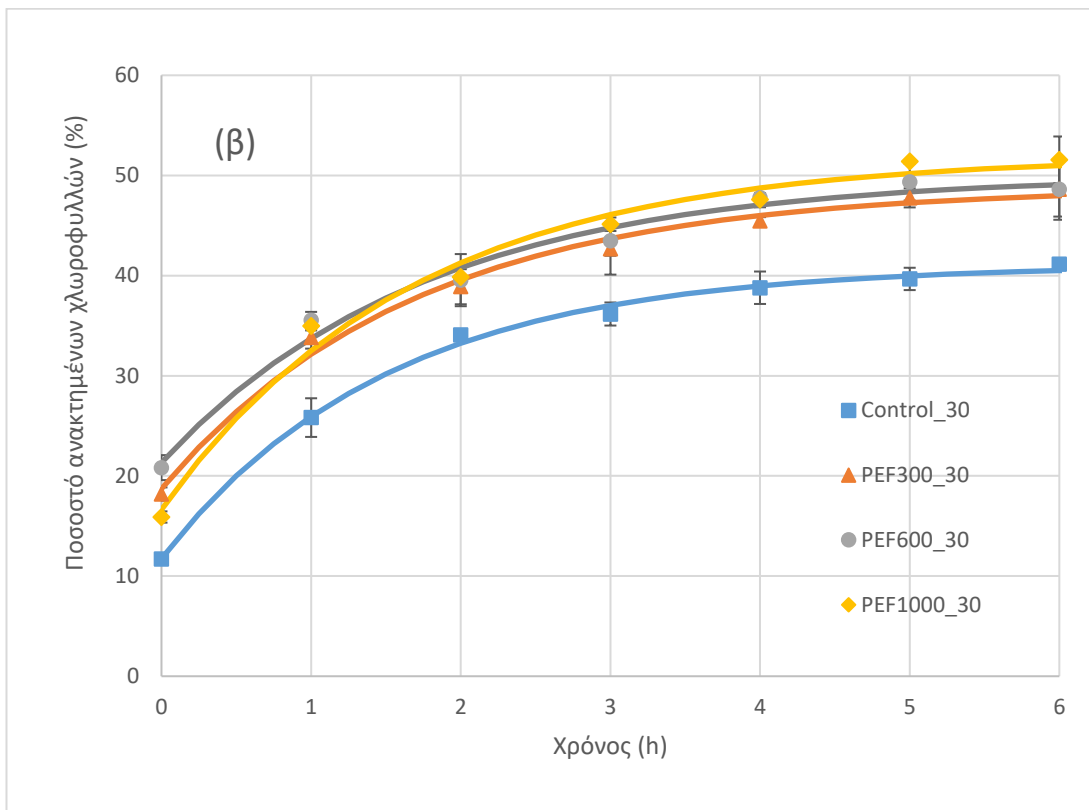
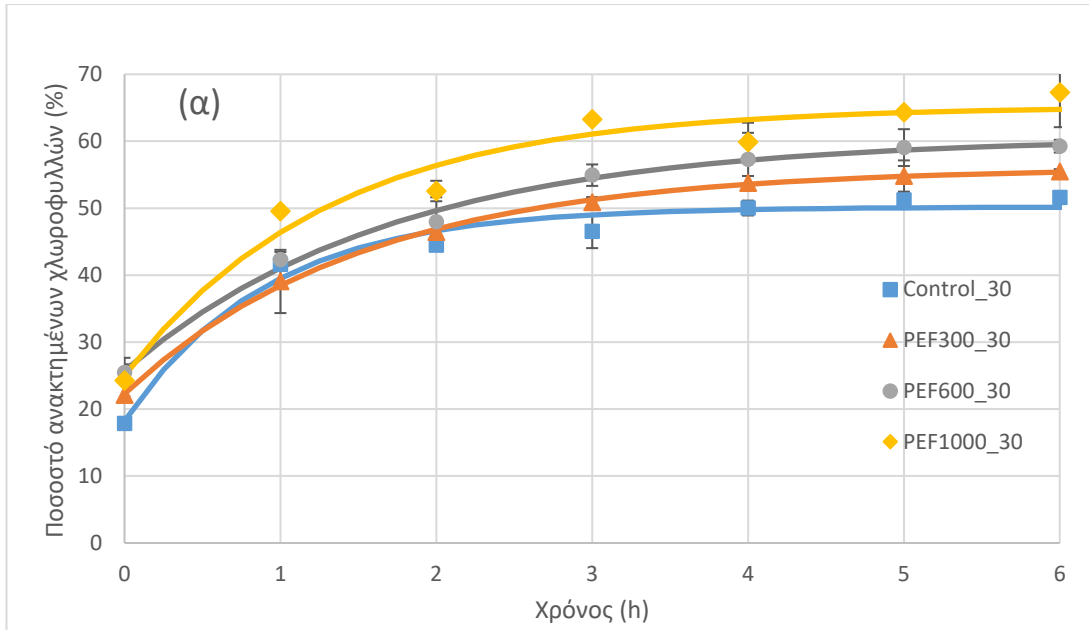
$$C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

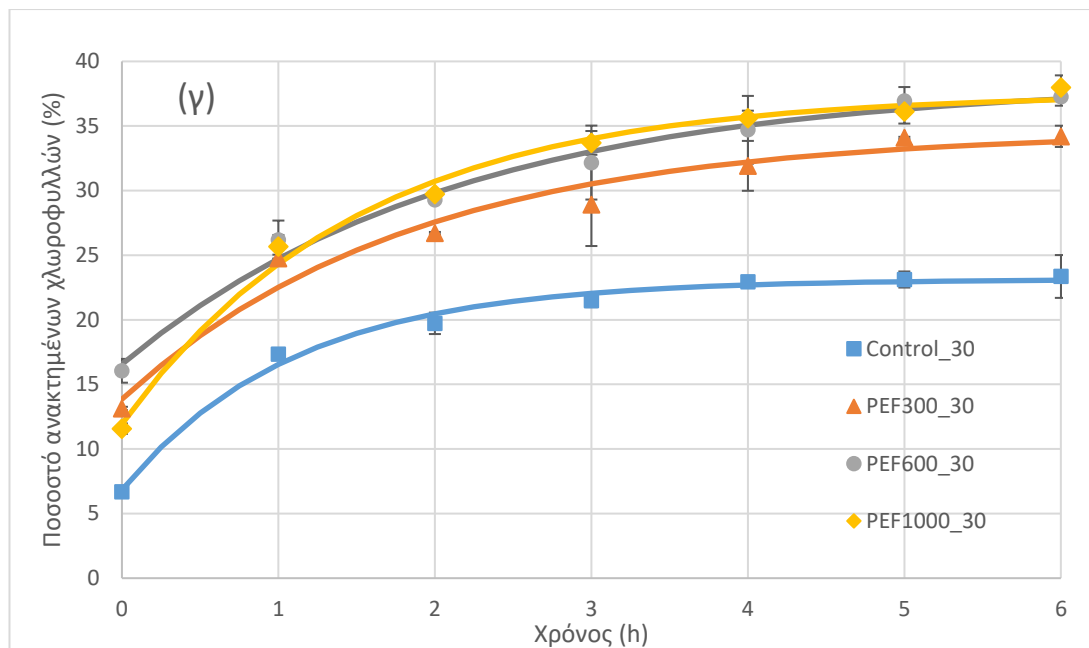
Ως C_e ορίζεται το τελικό ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών για $t \rightarrow \infty$, ως C_0 το αρχικό ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών για $t=0$, και ως τ θεωρείται ο χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης κατά τον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3 % του φαινομένου της εκχύλισης. Αυτό το μοντέλο δεν επιλέχθηκε έναντι άλλων μονάχα για τις ικανοποιητικές προσαρμογές στα πειραματικά σημεία ($R^2 > 0.9$), αλλά και λόγω των εύχρηστων παραμέτρων του, από τις οποίες μπορεί να γίνει κατανοητή η εξέλιξη της εκχύλισης σε κάθε χρονική στιγμή.

Ως C , ορίζεται το ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών εκφρασμένων σε mg ανακτημένων χλωροφυλλών/ mg ολικών χλωροφυλλών της βιομάζας. Επίσης, να σημειωθεί ότι, σε όλα τα παρακάτω διαγράμματα, τα σημεία τα οποία αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή $t = 0$, αναφέρονται πρακτικά στην απελευθέρωση των χλωροφυλλών τη στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία, ενώ σε ακριβή πειραματικό χρόνο παίρνουν την τιμή $t = \frac{5}{60} = 0.08 h$, δηλαδή των 5 min.

5.2.2 Μελέτη της κινητικής ανάκτησης των χλωροφυλλών

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, το μαθηματικό μοντέλο (4.6): $C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$ προσφέρει μια ικανοποιητική περιγραφή της κινητικής της εκχύλισης των χλωροφυλλών. Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα των πρωτογενών δεδομένων που περιγράφουν την εξέλιξη της εκχύλισης για κάθε συνθήκη (επεξεργασία, θερμοκρασία εκχύλισης, περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη), ενώ στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου ακολουθεί η παρουσίαση και ο σχολιασμός των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

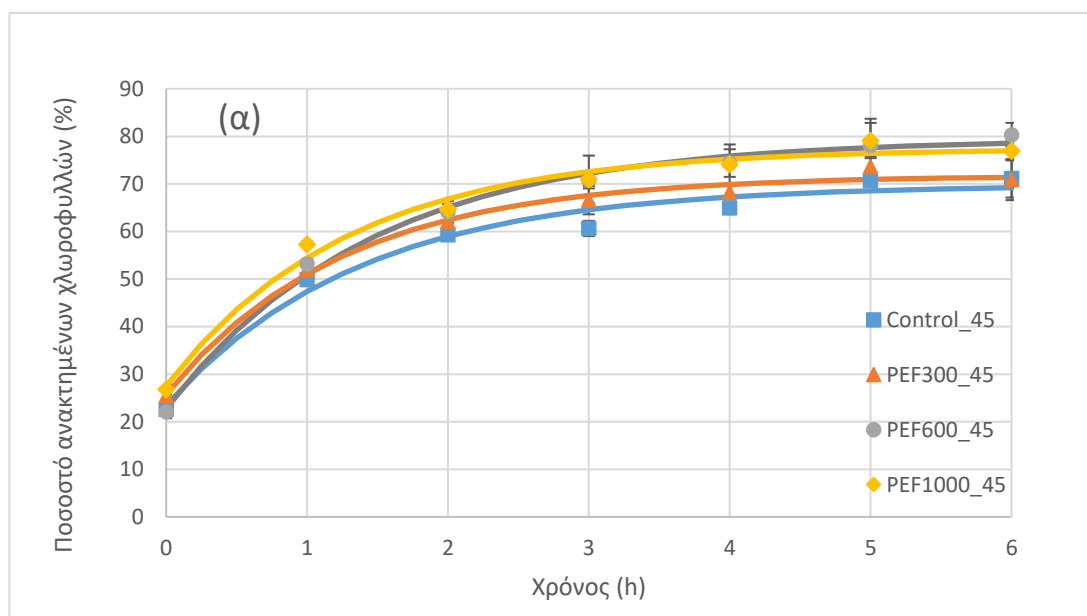


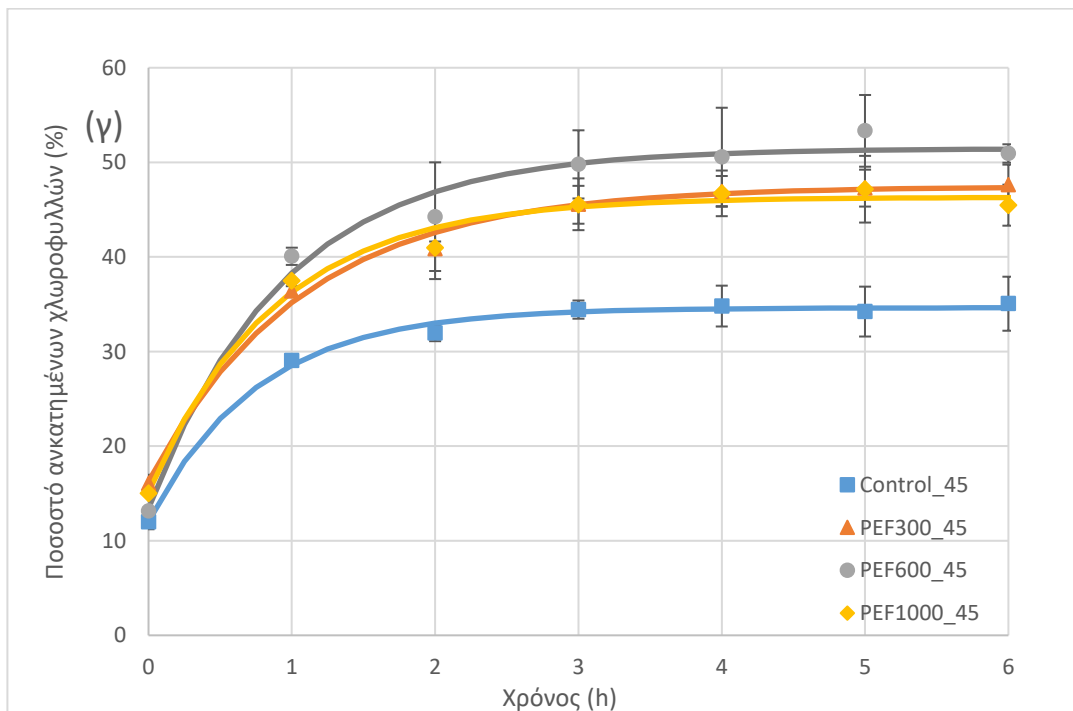
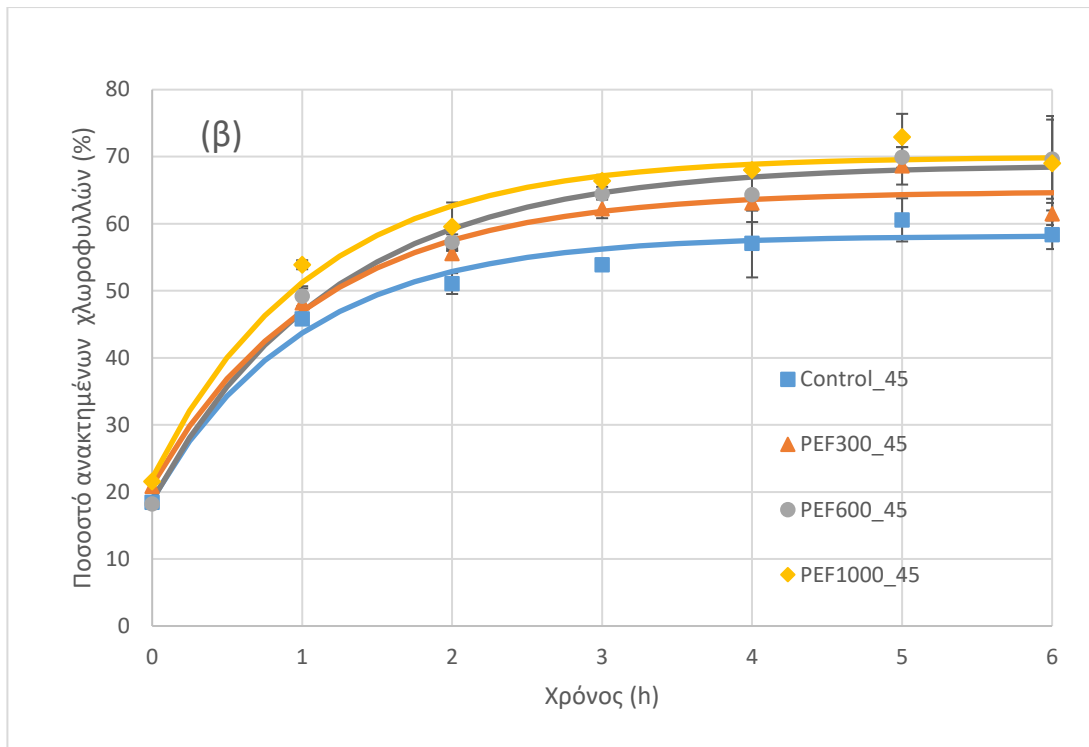


Διάγραμμα 5.1 : Ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 5.1**, η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* επιφέρει σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών ακόμη και από την έναρξη της διεργασίας της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, η συνθήκη PEF600 επιφέρει μία αρχική αύξηση του ποσοστού ανάκτησης από 6.6% σε 16.1% σε σχέση με την περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων για θερμοκρασία εκχύλισης 30°C και χρήση διαλύτη 75% v/v σε αιθανόλη. Σε κάθε περίπτωση, τα σημεία που αντιστοιχούν στα επεξεργασμένα κύτταρα είναι πάνω από τα αντίστοιχα σημεία που αντιστοιχούν στα μη επεξεργασμένα, οδηγώντας σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και της μεμβράνης των χλωροπλαστών των κυττάρων, εντός των οποίων περιέχονται οι φυσικές χρωστικές. Βάσει του **Διαγράμματος 5.1(α)**, η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 αυξάνει το ποσοστό ανάκτησης από 55.5% σε 67.3% την χρονική στιγμή των 6 h εκχύλισης. Ωστόσο, η τάση των σημείων μεταξύ των διαφόρων επεξεργασιών δεν φαίνεται να επηρεάζεται, γεγονός που δηλώνει πως η διεργασία της εκχύλισης δεν επιταχύνεται σημαντικά με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Επιπλέον, μεταξύ των τριών διαγραμμάτων, παρατηρείται πως η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη επιφέρει σημαντική μείωση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών μεταξύ των ίδιων επεξεργασιών. Για παράδειγμα, στην

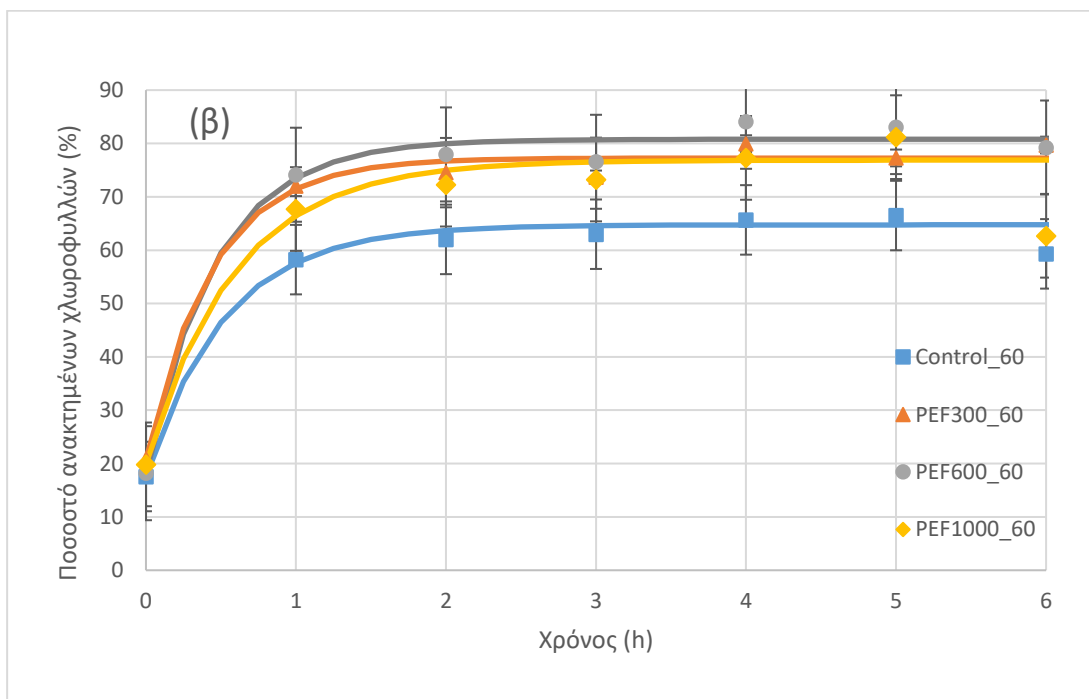
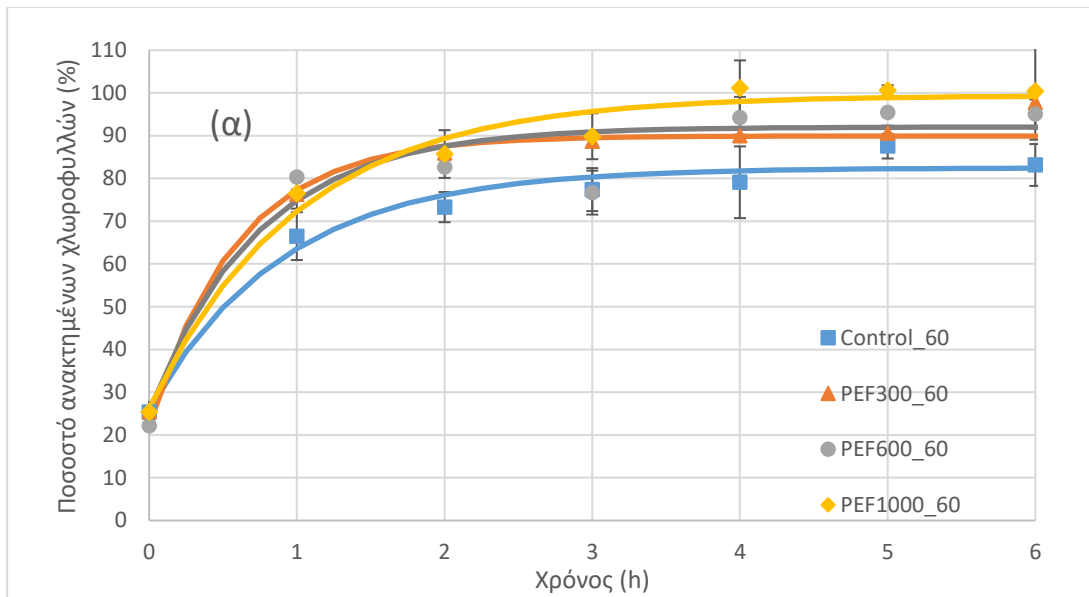
περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων, η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη από 95 σε 75% v/v επιφέρει ελάττωση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών έως και 33%, λόγω της αδιαλυτότητας των χλωροφυλλών νερό. Ωστόσο, με την εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορούν να επιτευχθούν αντίστοιχες αποδόσεις με εκείνες των ανεπεξέργαστων κυττάρων, μειώνοντας το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη. Για παράδειγμα, συγκρίνοντας τα **Διαγράμματα 5.1(α)** και **5.1(β)** παρατηρείται πως ύστερα από 6 h εκχύλισης η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 επιφέρει παραπλήσιο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών (~ 51%) χρησιμοποιώντας αιθανόλη 85% v/v, σε σχέση με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων και διαλύτη 95% v/v.

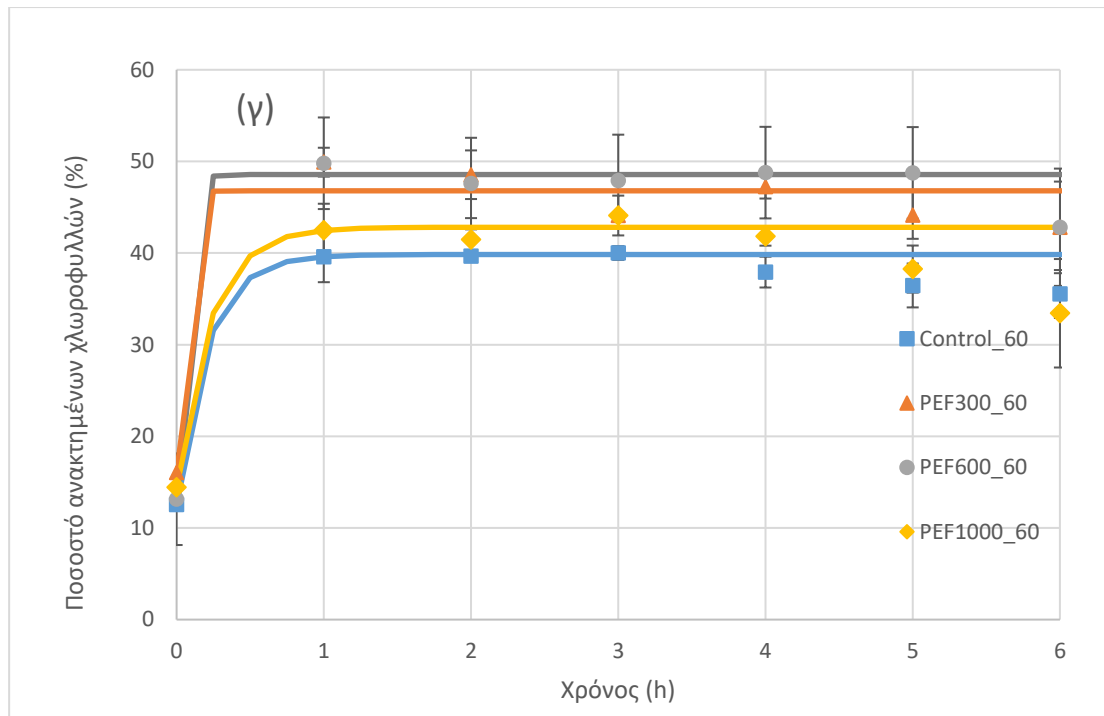




Διάγραμμα 5.2. Ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξεργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 45 °C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 5.2**, η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* επιφέρει σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών ακόμη και από την έναρξη της διεργασίας της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, η συνθήκη PEF600 επιφέρει μία αρχική αύξηση, για $t = 1$ h, του ποσοστού ανάκτησης από 29 % σε 40 % σε σχέση με την περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων για θερμοκρασία εκχύλισης 45°C και χρήση διαλύτη 75% v/v σε αιθανόλη. Σε κάθε περίπτωση, τα σημεία που αντιστοιχούν στα επεξεργασμένα κύτταρα είναι πάνω από τα αντίστοιχα σημεία που αντιστοιχούν στα μη επεξεργασμένα, οδηγώντας σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και της μεμβράνης των χλωροπλαστών των κυττάρων, εντός των οποίων περιέχονται οι φυσικές χρωστικές. Βάσει του **Διαγράμματος 5.2(α)**, η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 αυξάνει το ποσοστό ανάκτησης από 69% σε 79% την χρονική στιγμή των 6 h εκχύλισης. Ωστόσο, η τάση των σημείων μεταξύ των διαφόρων επεξεργασιών δεν φαίνεται να επηρεάζεται, γεγονός που δηλώνει πως η διεργασία της εκχύλισης δεν επιταχύνεται σημαντικά με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Επιπλέον, μεταξύ των τριών διαγραμμάτων, παρατηρείται πως η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη επιφέρει σημαντική μείωση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών μεταξύ των ίδιων επεξεργασιών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων, η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη από 95 σε 75% v/v επιφέρει ελάττωση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών έως και 31.4 %, λόγω της αδιαλυτότητας των χλωροφυλλών νερό. Ωστόσο, με την εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορούν να επιτευχθούν αντίστοιχες αποδόσεις με εκείνες των ανεπεξέργαστων κυττάρων, μειώνοντας το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη. Για παράδειγμα, συγκρίνοντας τα **Διαγράμματα 5.2(α)** και **5.2(β)** παρατηρείται πως ύστερα από 6 h εκχύλισης η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 επιφέρει παραπλήσιο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών (~ 70%) χρησιμοποιώντας αιθανόλη 85% v/v, σε σχέση με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων και διαλύτη 95% v/v.





Διάγραμμα 5.3 Ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 60 °C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 5.3**, η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* επιφέρει σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανακτημένων χλωροφυλλών ακόμη και από την έναρξη της διεργασίας της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, στο **Διάγραμμα 5.3(γ)**, η συνθήκη PEF600 επιφέρει μία αρχική αύξηση, για $t=2$ h, του ποσοστού ανάκτησης από 41 % σε 48 % σε σχέση με την περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων για θερμοκρασία εκχύλισης 60°C και χρήση διαλύτη 75% v/v σε αιθανόλη. Σε κάθε περίπτωση, τα σημεία που αντιστοιχούν στα επεξεργασμένα κύτταρα είναι πάνω από τα αντίστοιχα σημεία που αντιστοιχούν στα μη επεξεργασμένα, οδηγώντας σε μεγαλύτερες αποδόσεις και σε αυτήν την θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και της μεμβράνης των χλωροπλαστών των κυττάρων, εντός των οποίων περιέχονται οι φυσικές χρωστικές. Ωστόσο, λόγω της θερμότητας και της χαμηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη, μεγαλύτερο από 10 % το περιεχόμενο νερό, οι χρωστικές υφίστανται σταδιακή υποβάθμιση και η αύξηση των ανακτημένων χλωροφυλλών είναι λιγότερο σημαντική σε σύγκριση με τις προηγούμενες θερμοκρασίες εκχύλισης. Βάσει του **Διαγράμματος 5.3(α)**, η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 αυξάνει το ποσοστό ανάκτησης από 83% σε 100% την χρονική στιγμή των 6 h εκχύλισης. Ωστόσο, η τάση των

σημείων μεταξύ των διαφόρων επεξεργασιών δεν φαίνεται να επηρεάζεται, γεγονός που δηλώνει πως η διεργασία της εκχύλισης δεν επιταχύνεται σημαντικά με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Συγκρίνοντας, τώρα τα **Διαγράμματα 5.3(α)** και **5.3(β)** παρατηρείται πως ύστερα από 6 h εκχύλισης η εφαρμογή της συνθήκης PEF300 επιφέρει παραπλήσιο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών (~80%) χρησιμοποιώντας αιθανόλη 85% v/v, σε σχέση με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων και διαλύτη 95% v/v.

5.2.3 Μέγιστο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών (C_e)

Με την χρήση της εξίσωσης $C = C_e - (C_e - C_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$ στα πειραματικά δεδομένα προέκυψαν οι παράμετροι C_e , C_0 και τ , οι οποίες εκφράζουν το μέγιστο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών, το ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών στον χρόνο εκχύλισης $t=0$ και τον χαρακτηριστικό χρόνο εκχύλισης, αντίστοιχα.

Ακολουθεί ο **Πίνακας 5.1** στον οποίο παρουσιάζονται οι τιμές της παραμέτρου C_e , όπως προέκυψαν από την μαθηματική μοντελοποίηση των ποσοστών ανακτημένων χλωροφυλλών για κάθε συνθήκη εκχύλισης (επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, θερμοκρασία εκχύλισης, περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη) ως προς τον χρόνο εκχύλισης.

Πίνακας 5.1: Μέγιστο ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών (%) από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Control			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	50.2 ± 0.8 ^{ij}	69.8 ± 1.6 ^{no}	82.5 ± 2.1 ^s
85% Αιθανόλη	41.0 ± 0.7 ^{df}	58.2 ± 1.2 ^k	64.7 ± 1.4 ^m
75% Αιθανόλη	23.1 ± 0.4 ^a	34.6 ± 0.6 ^b	39.8 ± 0.7 ^{cd}
PEF 300			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	56.1 ± 1.3 ^k	71.8 ± 1.4 ^o	92.0 ± 1.4 ^t
85% Αιθανόλη	48.4 ± 1.2 ^{hi}	64.8 ± 1.6 ^k	77.3 ± 1.2 ^{pq}
75% Αιθανόλη	34.6 ± 1.4 ^b	47.4 ± 1.3 ^{gh}	46.8 ± 0.9 ^{gh}
PEF 600			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	60.6 ± 1.4 ^k	79.5 ± 1.5 ^{qr}	89.9 ± 2.5 ^t
85% Αιθανόλη	50.0 ± 1.3 ^{hi}	68.8 ± 1.2 ⁿ	80.8 ± 1.4 ^{rs}
75% Αιθανόλη	38.4 ± 1.3 ^b	51.5 ± 0.9 ^j	48.6 ± 0.6 ^{ghi}
PEF 1000			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	65.2 ± 1.8 ^m	77.4 ± 1.6 ^{pq}	99.4 ± 2.6 ^u
85% Αιθανόλη	52.0 ± 1.1 ^j	70.0 ± 1.6 ^{no}	76.9 ± 1.5 ^p
75% Αιθανόλη	37.5 ± 0.6 ^c	46.3 ± 0.8 ^g	42.8 ± 1.0 ^f

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.1** οριζοντίως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, εξαιρώντας τους 60 °C για 75% αιθανόλη, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών ανάκτησης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η θερμοκρασία εκχύλισης παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ανάκτηση των χλωροφυλλών. Συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 30 σε 60°C με χρήση αιθανόλης 95% αύξησε το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης κατά 32% στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων και κατά 34% στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων PEF1000. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αύξηση της εκχυλισιμότητας των συστατικών αυτών με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς η μεμβράνη και το τοίχωμα των κυττάρων υποβαθμίζονται και η κινητική των μορίων αυξάνεται. Σχετικά με τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 60 °C με χρήση αιθανόλης 75%, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για την συνθήκη PEF300, ενώ για τις συνθήκες PEF600 και PEF1000 παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού C_e , σε σχέση με τους 45 °C. Σύμφωνα με τον Hartmut K. Lichtenthaler (1987) η έκθεση των χλωροφυλλών σε υψηλές θερμοκρασίες και η παραμονή τους σε διαλύτες οι οποίοι περιέχουν ποσοστό νερού μεγαλύτερο από 10%, ευνοούν την υποβάθμιση των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες, δηλαδή στην απομάκρυνση του μαγνησίου των χλωροφυλλών. Επομένως, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης στους 60 °C σε 75% αιθανόλη πιθανότατα αυξάνει την εκχυλισιμότητα των χλωροφυλλών όπως και στις υπόλοιπες περιπτώσεις, αλλά παράλληλα προκαλεί και έντονη υποβάθμισή αυτών, η οποία οδηγεί σε μειωμένες τιμές C_e .

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.1** καθέτως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης, συμπεραίνεται πως και η περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, εφόσον ούτε σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται αλληλοεπικαλύψεις των εκθετών μεταξύ των C_e . Για τις θερμοκρασίες εκχύλισης 30 και 45°C η αύξηση της αιθανόλης του διαλύτη από 75 σε 95% v/v επιφέρει αύξηση των ανακτημένων χλωροφυλλών έως και 30%, ενώ στους 60°C η αύξηση του C_e αγγίζει το 56% στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με τη συνθήκη

PEF1000. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται με βάση την ευδιαλυτότητα των χλωροφυλλών στην αιθανόλη, ενώ στους 60°C η εντονότερη αύξηση του C_e εικάζεται πως οφείλεται στις μειωμένες τιμές C_e λόγω υποβάθμισης των χλωροφυλλών στην χαμηλή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης, όπως περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο.

Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω σχολιασμός με ανάγνωση του **Πίνακα 5.1** διαγωνίως. Έτσι παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί ελάττωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη, ώστε να επιτευχθούν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές του μεγίστου ποσοστού ανάκτησης, και αντιστρόφως. Για παράδειγμα στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με PEF300 οι τιμές C_e για εκχύλιση στους 45°C και σε αιθανόλη 85 και 75% δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για εκχύλιση στους 30°C και σε αιθανόλη 95 και 85%. Ο σχηματισμός πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και στην μεμβράνη των χλωροπλαστών των κυττάρων λόγω της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ερμηνεύει αυτό το αποτέλεσμα, εφόσον τα μόρια των χρωστικών αυτών μπορούν ευκολότερα να διαπεράσουν τα εμπόδια των κυττάρων και να μεταφερθούν στην φάση του διαλύτη.

Τέλος, εξετάζοντας την επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παρατηρείται πως για δεδομένη θερμοκρασία εκχύλισης μπορεί να μειωθεί το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη, ώστε να επιτευχθούν αντίστοιχες αποδόσεις. Για παράδειγμα η εφαρμογή οποιασδήποτε συνθήκης PEF επιτυγχάνει ελάττωση της αιθανόλης από 95 σε 85% για εκχυλίσεις στους 30°C σε σχέση με κύτταρα Control. Επίσης οι συνθήκες PEF600 και PEF1000 επιφέρουν το ίδιο αποτέλεσμα σε σχέση με τα κύτταρα Control στους 45°C, ελαττώνοντας την αιθανόλη από 95 σε 85%.

5.2.4 Αρχικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών (C_0)

Πίνακας 5.2. Αρχικό ποσοστό περιεχόμενων χλωροφυλλών (%) από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Control			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	18.2 ± 1.5 ^{fghij}	23.4 ± 2.1 ^{lmno}	25.9 ± 3.7 ^{nop}
85% Αιθανόλη	11.7 ± 0.8 ^b	18.9 ± 2.0 ^{ghijk}	17.6 ± 2.6 ^{efghi}
75% Αιθανόλη	6.8 ± 0.6 ^a	12.1 ± 1.1 ^{bc}	12.6 ± 0.9 ^{bcd}
PEF 300			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	22.3 ± 1.4 ^{ijklmno}	25.7 ± 1.9 ^{nop}	25.6 ± 2.7 ^{nop}
85% Αιθανόλη	18.7 ± 1.2 ^{ghijk}	21.0 ± 2.4 ^{ijklm}	20.9 ± 2.5 ^{ijkl}
75% Αιθανόλη	13.9 ± 1.3 ^{bcde}	16.3 ± 2.1 ^{defgh}	16.1 ± 2.1 ^{cdefgh}
PEF 600			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	25.7 ± 1.4 ^{nop}	22.8 ± 1.8 ^{klmno}	22.4 ± 5.1 ^{klmno}
85% Αιθανόλη	21.3 ± 1.3 ^{ijklm}	18.7 ± 1.7 ^{ghijk}	18.2 ± 2.7 ^{fghij}
75% Αιθανόλη	16.6 ± 1.3 ^{defgh}	13.4 ± 1.6 ^{bcd}	13.1 ± 1.3 ^{bcd}
PEF 1000			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	25.0 ± 2.5 ^{mno}	27.5 ± 2.2 ^p	26.2 ± 4.3 ^{op}
85% Αιθανόλη	16.6 ± 1.2 ^{defgh}	22.1 ± 2.5 ^{ijklmn}	20.0 ± 2.6 ^{hijkl}
75% Αιθανόλη	11.9 ± 0.7 ^b	15.2 ± 1.4 ^{bcdefg}	14.4 ± 1.4 ^{bcdef}

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.2** οριζοντίως, σε διαφορετική θερμοκρασία, αλλά σε σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρχικών ποσοστών χλωροφυλλών στα δείγματα. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στο ότι για χρόνο μηδέν, η θερμοκρασία των δειγμάτων δεν είχε σταθεροποιηθεί, με αποτέλεσμα η εκχύλιση να αρχίζει πρακτικά από την ίδια θερμοκρασία για όλα τα δείγματα.

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.2** καθέτως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης, συμπεραίνεται πως η περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, εφόσον δεν παρατηρούνται αλληλοεπικαλύψεις των εκθετών μεταξύ των C_0 . Για τις θερμοκρασίες εκχύλισης 30 και 45°C η αύξηση της αιθανόλης του διαλύτη από 75 σε 95% v/v επιφέρει αύξηση των αρχικών χλωροφυλλών έως και 50%, ενώ στους 60°C η αύξηση του C_0 αγγίζει το 45 % στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με τη συνθήκη PEF1000. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται με βάση την ευδιαλυτότητα των χλωροφυλλών στην αιθανόλη, ενώ στους 60°C η εντονότερη αύξηση του C_0 εικάζεται πως οφείλεται στις μειωμένες τιμές C_0 λόγω υποβάθμισης των χλωροφυλλών σε περιεκτικότητα αιθανόλης 75 % v/v του διαλύτη της εκχύλισης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο **5.2.3**.

Τέλος, εξετάζοντας την επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παρατηρείται πως αυτή δεν είναι σημαντική. Αυτό τεκμηριώνεται και από τα μικρότερα ποσοστά αυξήσεων του C_0 στα επεξεργασμένα κύτταρα, σε σχέση με τα μη διαρρηγμένα. Πρόκειται για αρχικές συγκεντρώσεις στο χρόνο μηδέν, οπότε το φαινόμενο της εκχύλισης δεν έχει προλάβει να εξελιχθεί, ώστε να φανούν οι επιδράσεις της προκατεργασίας τόσο έντονα, όσο παρατηρήθηκε στο τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών στις έξι ώρες.

5.2.5 Χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης (τ)

Πίνακας 5.3. Χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης (τ σε h) των χλωροφυλλών από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Control			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	0.91 ± 0.1 ^{defgh}	1.38 ± 0.2 ^{klm}	0.91 ± 0.2 ^{defgh}
85% Αιθανόλη	1.51 ± 0.1 ^{lmno}	1.00 ± 0.1 ^{efghij}	0.53 ± 0.1 ^{bc}
75% Αιθανόλη	1.10 ± 0.1 ^{fghijk}	0.76 ± 0.1 ^{cdef}	0.21 ± 0.2 ^{ab}
PEF 300			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	1.54 ± 0.2 ^{lmno}	1.25 ± 0.2 ^{hijkl}	0.74 ± 0.1 ^{cde}
85% Αιθανόλη	1.70 ± 0.2 ^{mno}	1.11 ± 0.2 ^{fghijk}	0.44 ± 0.1 ^{bc}
75% Αιθανόλη	1.85 ± 0.4 ^{op}	1.08 ± 0.2 ^{efghijk}	0.04 ± 0.0 ^a
PEF 600			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	1.73 ± 0.2 ^{no}	1.46 ± 0.1 ^{lmn}	0.60 ± 0.2 ^{cd}
85% Αιθανόλη	1.77 ± 0.3 ^{no}	1.21 ± 0.1 ^{ghijkl}	0.46 ± 0.1 ^{bc}
75% Αιθανόλη	2.14 ± 0.4 ^p	0.94 ± 0.1 ^{efghi}	0.05 ± 0.0 ^a
PEF 1000			
	30°C	45°C	60°C
95% Αιθανόλη	1.31 ± 0.2 ^{ijkl}	1.29 ± 0.2 ^{ijkl}	1.00 ± 0.2 ^{efghij}
85% Αιθανόλη	1.67 ± 0.2 ^{mno}	1.07 ± 0.2 ^{efghijk}	0.59 ± 0.1 ^{cd}
75% Αιθανόλη	1.51 ± 0.1 ^{lmno}	0.88 ± 0.1 ^{defg}	0.23 ± 0.3 ^{ab}

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

\pm η τυπική απόκλιση

Σύμφωνα με τον παραπάνω **Πίνακα 5.3**, παρατηρείται ότι με όποιο τρόπο και αν διαβαστεί, οριζοντίως, καθέτως ή διαγωνίως, δεν υπάρχει κάποια λογική στις διαφορές που προκύπτουν. Ο χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης τ , υποδεικνύει την χρονική στιγμή κατά την οποία η τιμή C είναι τέτοια ώστε η διαφορά $C - C_0$ να ισούται με το 63,3% της διαφοράς $C_e - C_0$. Εφόσον κάθε συνθήκη χαρακτηρίζεται από διαφορετικές τιμές C_e και πρακτικά ίδιες τιμές C_0 , είναι λογικό η παράμετρος τ να μην δίνει σημαντικές πληροφορίες ως προς την σύγκριση των διάφορων παραμέτρων της εκχύλισης. Για τον λόγο αυτό, εξετάζεται η παράμετρος t_{95} , η οποία έχει αναλυθεί στο **Κεφάλαιο 4**, ώστε να σχολιαστεί η επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην επίτευξη του 95 % της απόδοσης εκχύλισης χλωροφυλλών των ανεπεξέργαστων δειγμάτων, σε μικρότερο χρόνο.

5.2.6 Επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στον χρόνο t_{95} της εκχύλισης

Πίνακας 5.4. Χρόνος t_{95} της εκχύλισης των χλωροφυλλών για κάθε επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, θερμοκρασία εκχύλισης και περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη.

T = 30 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	2.31 ± 0.28 ^a	4.01 ± 0.30 ^b	2.91 ± 0.27 ^c
PEF 300	2.13 ± 0.20 ^a	1.88 ± 0.16 ^a	0.90 ± 0.06 ^b
PEF 600	1.71 ± 0.15 ^c	1.68 ± 0.15 ^a	0.75 ± 0.02 ^{ab}
PEF 1000	1.08 ± 0.10 ^b	1.67 ± 0.12 ^a	0.60 ± 0.04 ^a
T = 45 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	3.55 ± 0.44 ^c	1.26 ± 0.15 ^b	1.37 ± 0.17 ^b
PEF 300	2.66 ± 0.35 ^b	0.44 ± 0.05 ^a	0.25 ± 0.03 ^a
PEF 600	2.12 ± 0.21 ^{ab}	0.35 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.02 ^a
PEF 1000	1.92 ± 0.23 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.02 ^a
T = 60 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	0.89 ± 0.14 ^b	1.41 ± 0.29 ^b	0.54 ± 0.02 ^a
PEF 300	0.23 ± 0.04 ^a	0.56 ± 0.11 ^a	0.50 ± 0.01 ^a
PEF 600	0.22 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.10 ^a	0.40 ± 0.01 ^a
PEF 1000	0.20 ± 0.03 ^a	0.77 ± 0.11 ^a	0.38 ± 0.04 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών των χρόνων t_{95} , για ίδιες συνθήκες εκχύλισης (σταθερή θερμοκρασία και περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη), όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

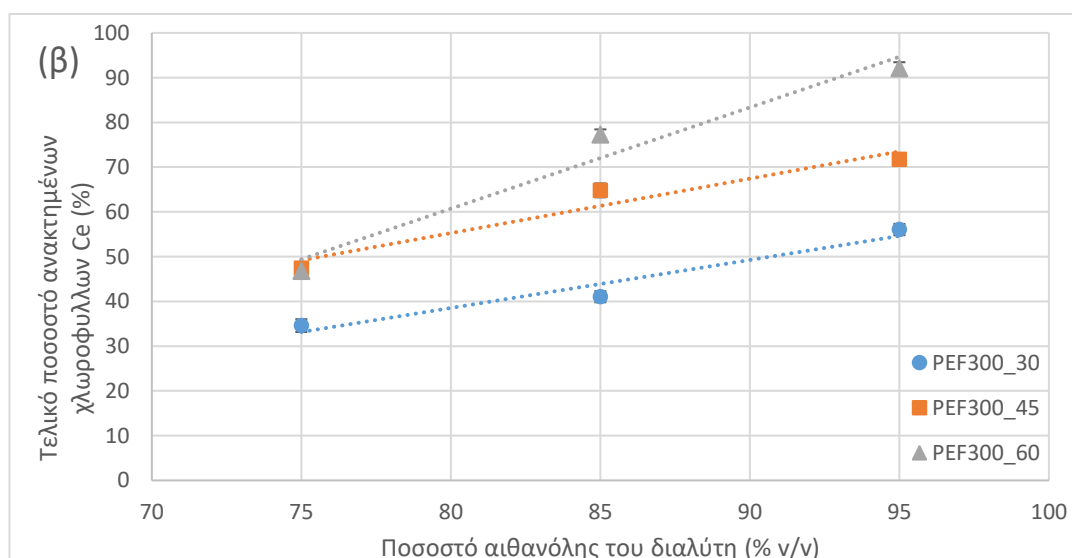
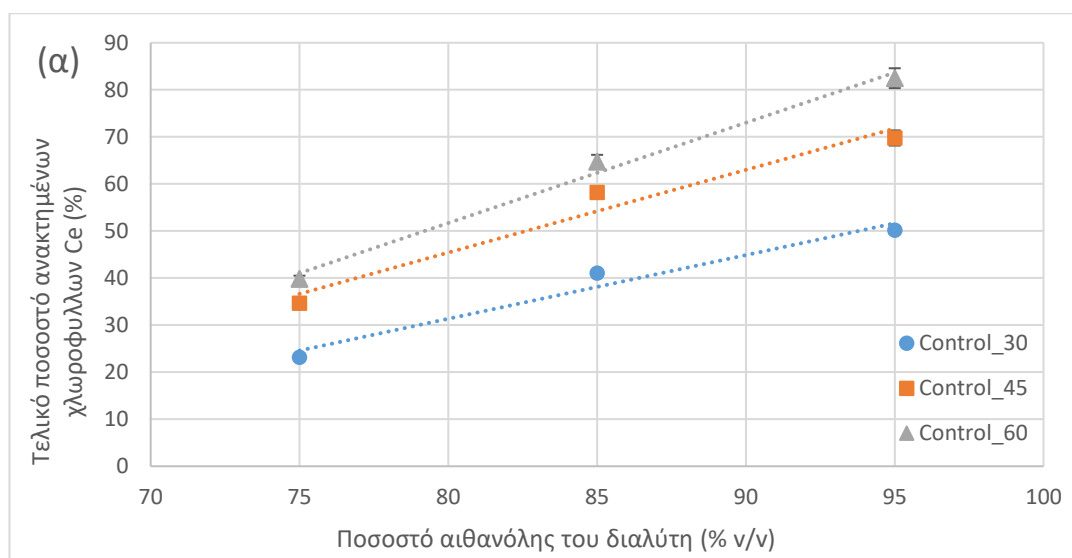
± η τυπική απόκλιση

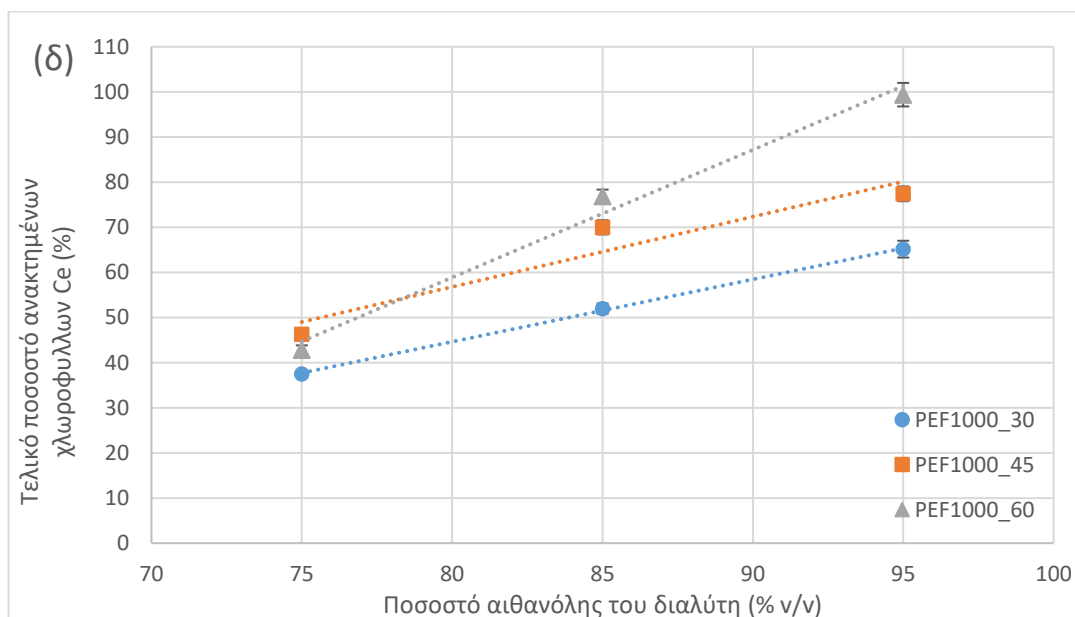
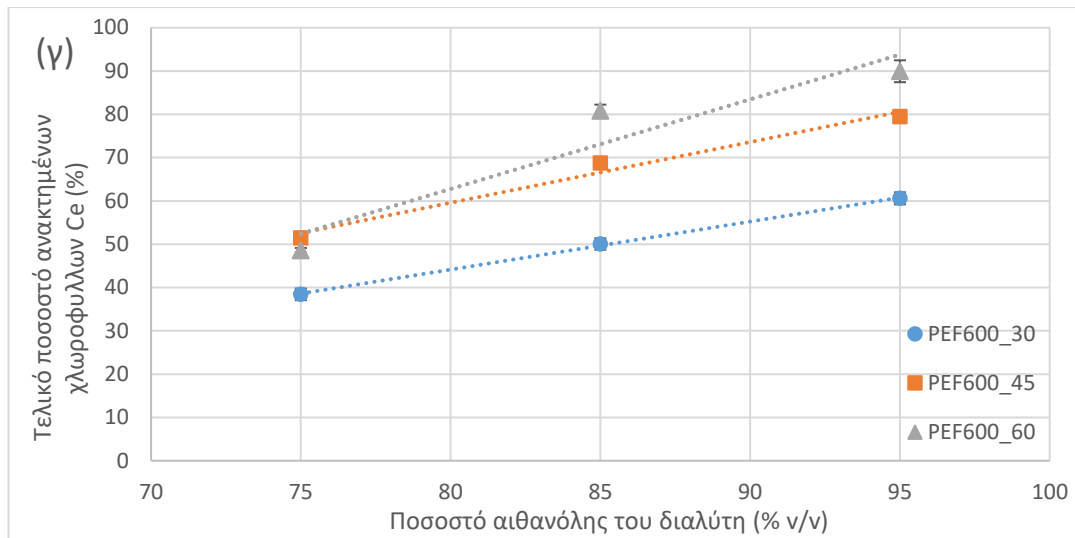
Στον Πίνακα 5.4, τα δεδομένα διαβάζονται κάθετα για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων μόνο όσον αφορά την επίδραση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στον χρόνο t_{95} . Σε θερμοκρασία 30°C, σε όλες τις περιεκτικότητες του διαλύτη σε αιθανόλη, παρατηρείται ότι ο χρόνος μειώνεται σημαντικά από τη συνθήκη PEF300 και μετά. Αυτό εξηγείται γιατί, αυξανόμενων των παλμών, αυξάνεται και η ειδική ενέργεια της επεξεργασίας, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται το 95 % του τελικού ποσοστού ανάκτησης χλωροφυλλών των ανεπεξέργαστων δειγμάτων, να επιτυγχάνεται σε μικρότερο χρόνο, αφού ενισχύεται η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Να σημειωθεί πως, μικρότεροι χρόνοι t_{95} , δεν συνεπάγονται επιτάχυνση της διεργασίας της εκχύλισης. Η παράμετρος t_{95} χρησιμοποιείται για να δείξει τον χρόνο εκχύλισης κατά τον οποίο το ποσοστό ανάκτησης των χλωροφυλλών ισούται με το 95 % του C_e , από μία εκχύλιση αναφοράς (εκχύλιση από ανεπεξέργαστα κύτταρα για σταθερή τιμή θερμοκρασίας και ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη).

Ειδικότερα, στη συνθήκη PEF 600 στους 45°C και για σταθερή περιεκτικότητα σε αιθανόλη 85 % v/v, παρατηρείται ότι ο χρόνος έχει μειωθεί κατά σχεδόν 70 % σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα CONTROL. Ο χρόνος μειώνεται από την τιμή (1.26 ± 0.15) h στην τιμή (0.35 ± 0.03) h. Αντίστοιχο προφίλ παρουσιάζει ο χρόνος και στις άλλες δύο θερμοκρασίες των 45°C και 60°C, καθώς και σε όλες τις περιεκτικότητες σε αιθανόλη του διαλύτη. Ωστόσο, στη θερμοκρασία των 60°C και με χρήση διαλύτη 75 % σε αιθανόλη, οι τιμές τείνουν στο μηδέν. Αυτό συμβαίνει λόγω της υποβάθμισης που υφίστανται οι χρωστικές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των χλωροφυλλών του εκχυλίσματος ήδη για χρόνους μικρότερους της μίας ώρας. Σε κάθε περίπτωση οι ελάχιστες τιμές t_{95} με τις σημαντικότερες διαφορές σε σχέση με εκείνες των ανεπεξέργαστων κυττάρων, προκύπτουν με την εφαρμογή της συνθήκης PEF1000.

5.2.7 Επίδραση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης στα τελικά ανακτημένα ποσοστά χλωροφυλλών

Προκειμένου να σχολιαστεί πιο αναλυτικά η επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη, στην απόδοση της εκχύλισης ως προς τις τελικές ανακτημένες χλωροφύλλες, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα, στα οποία αναπαρίστανται το τελικό ποσοστό ανάκτησης C_e , ως προς το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη για δεδομένη θερμοκρασία εκχύλισης και συνθήκη επεξεργασίας.





Διάγραμμα 5.4: Τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών C_e συναρτήσεϊ του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης για ανεπεξέργαστα (α) και επεξεργασμένα κύτταρα με τις συνθήκες PEF300 (β), PEF600 (γ) και PEF1000 (δ) σε όλες τις θερμοκρασίες εκχύλισης. Οι γραμμές απεικονίζουν απλή γραμμική προσαρμογή στα πειραματικά σημεία.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας, καθώς και στο ανεπεξέργαστο δείγμα, αυξανόμενης της περιεκτικότητας της αιθανόλης, αυξάνεται και το τελικό ποσοστό των ανακτημένων χλωροφυλλών, λόγω της διαλυτότητας των αυτών στην αιθανόλη. Ακόμα, παρατηρείται πως για τις θερμοκρασίες 30 και 45°C και για κάθε επεξεργασία, οι γραμμικές προσαρμογές δίνουν μια εικόνα παράλληλων ευθειών, γεγονός που υποδεικνύει την σταθερή επίδραση του ποσοστού αιθανόλης στην απόδοση της εκχύλισης ως προς τις χλωροφύλλες. Ωστόσο, στους 60°C η γραμμική τάση των σημείων είναι

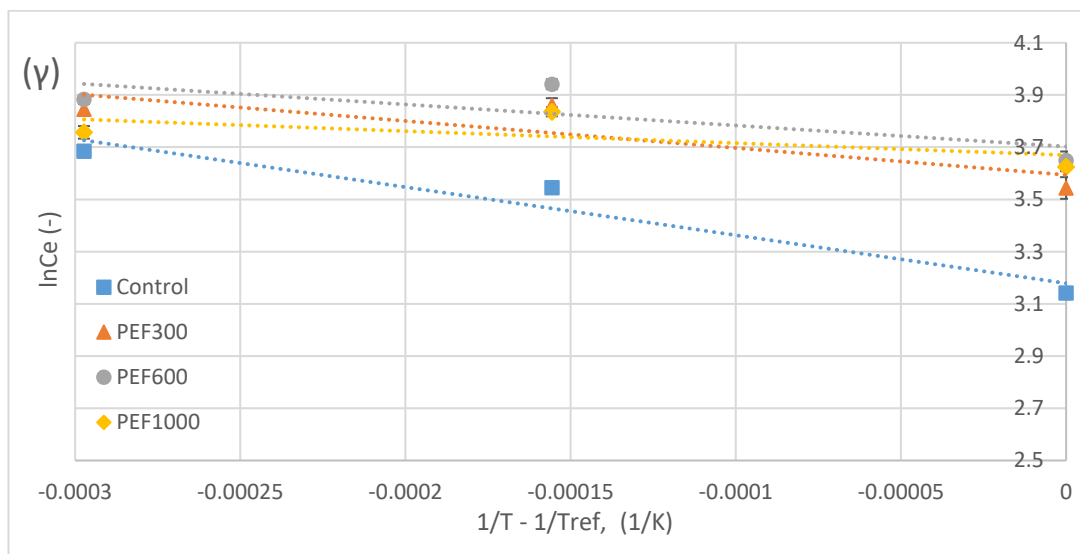
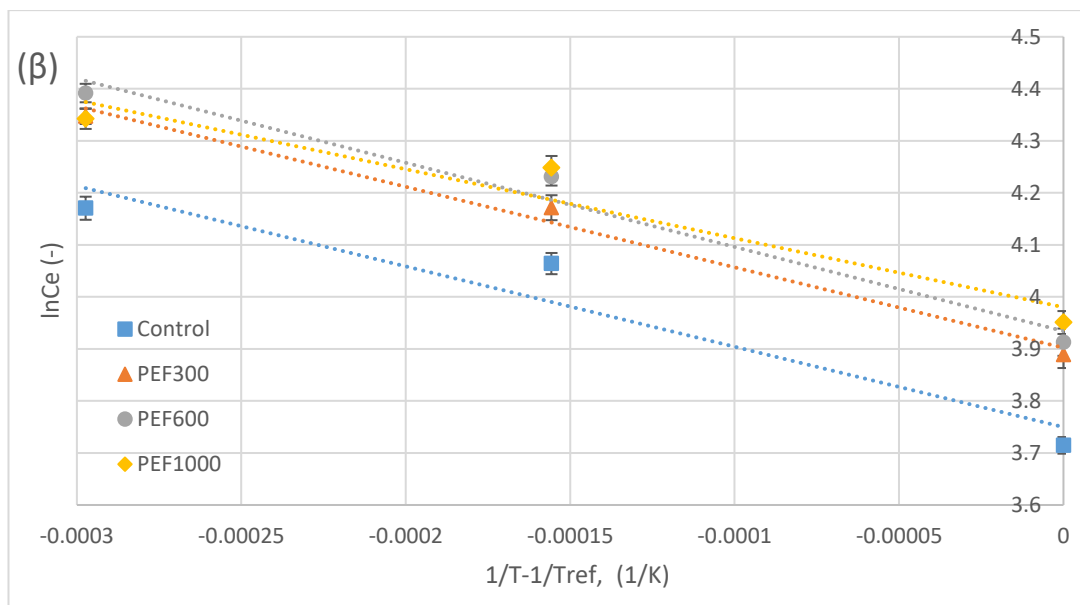
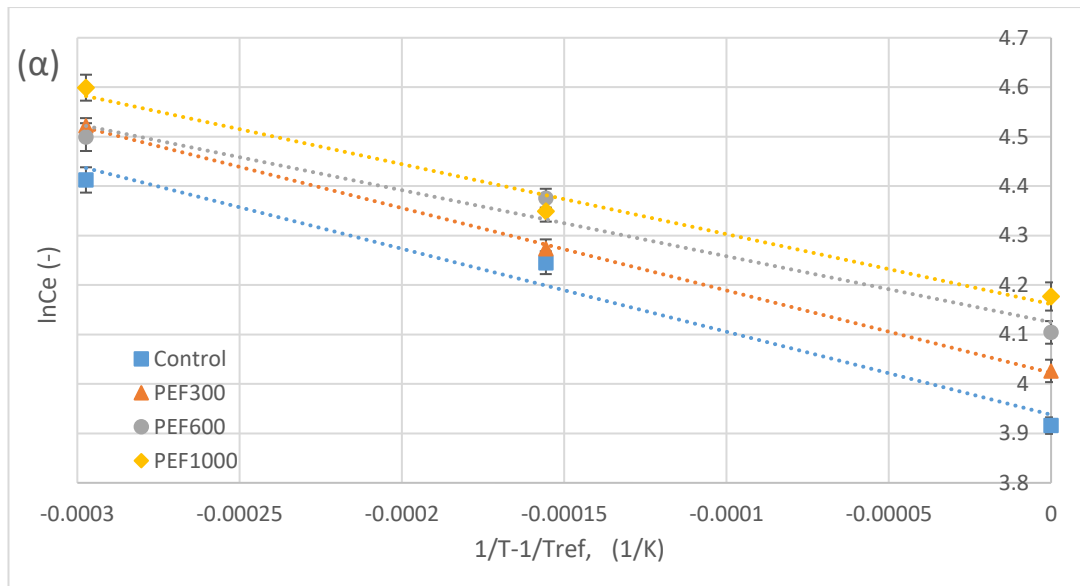
πιο απότομη. Η πιο απότομή κλίση οφείλεται στα σημεία που αντιστοιχούν σε 75% αιθανόλη τα οποία, όπως σχολιάστηκε και στην **Παράγραφο 5.2.3** δεν διαφέρουν σημαντικά με τα αντίστοιχα C_e που προκύπτουν στην θερμοκρασία των 45°C. Είναι ξεκάθαρο πως για να ίσχυε η παραλληλία των ευθειών και στις τρεις θερμοκρασίες θα έπρεπε τα συγκεκριμένα σημεία να ήταν μετατοπισμένα προς τα πάνω. Παρ' όλα αυτά, οι χαμηλότερες τιμές των σημείων αυτών επιβεβαιώνουν την υποβάθμιση των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες, η οποία όπως εξηγήθηκε και παραπάνω οφείλεται στην έκθεση των χλωροφυλλών σε υψηλές θερμοκρασίες και στην παραμονή τους σε διαλύτες οι οποίοι περιέχουν ποσοστό νερού μεγαλύτερο από 10% (Hartmut K. Lichtenthaler, 1987).

5.2.8 Επίδραση της θερμοκρασίας της εκχύλισης στην ανάκτηση των χλωροφυλλών

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της εκχύλισης όσον αφορά στις χλωροφύλλες, αφού έγινε χρήση του μοντέλου της **Εξίσωσης 4.9**, για κάθε επεξεργασία και περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, εφαρμόστηκε η εξίσωση του Arrhenius στην παράμετρο C_e , στο τελικό δηλαδή ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών.

$$\ln C_e = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + \ln C_{ref}$$

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius καθώς και οι δείκτες R^2 κάθε προσαρμογής.



Διάγραμμα 5.5: Διαγράμματα Arrhenius για το τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών C_e για κάθε επεξεργασία και περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95%, (β) 85% και (γ) 75%

Πίνακας 5.5: Παράμετρος R^2 για κάθε προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius

R^2				
% Αιθανόλη	Control	PEF 300	PEF 600	PEF 1000
95	0.9749	0.9992	0.9659	0.9825
85	0.9281	0.9887	0.9746	0.9314
75	0.9409	0.8401	0.7999	0.7115

Παρατηρώντας το **Διάγραμμα 5.5** διαπιστώνεται πως οι ευθείες που προκύπτουν από την προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius είναι μεταξύ τους πρακτικά παράλληλες στο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος, εκτός από εκείνες που αντιστοιχούν σε διαλύτη με περιεκτικότητα αιθανόλης 75%. Εστιάζοντας στο **Διάγραμμα 5.5 (α)** παρατηρείται μια ανοδική μετατόπιση των ευθειών συναρτήσεως της ενέργειας επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Αυτό υποδεικνύει την αυξημένη απόδοση της εκχύλισης των χλωροφυλλών με την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η εξάρτηση του φαινομένου από την θερμοκρασία εκχύλισης. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο **Διάγραμμα 5.5 (β)**. Μεταξύ των διάφορων συνθηκών PEF, παρατηρείται πως η συνθήκη PEF600 ταυτίζεται με την PEF1000, γεγονός που υποδεικνύει πως η PEF600 προτιμάται έναντι των άλλων δύο, γιατί επιφέρει σημαντικές διαφορές σε σχέση με την PEF300 και επιτυγχάνει πρακτικά το ίδιο αποτέλεσμα με την PEF1000, όσον αφορά την απόδοση της ανάκτησης των χλωροφυλλών. Εστιάζοντας στο **Διάγραμμα 5.5 (γ)** παρατηρείται σημαντική αύξηση των τιμών $\ln C_e$ στους 30°C έως και κατά 0.5 λογαρίθμους μεταξύ των επεξεργασμένων και του ανεπεξέργαστου δείγματος. Παρόλα αυτά στους 60°C οι διαφορές αυτή παύει να είναι σημαντική, γεγονός που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα διαγράμματα. Επιπροσθέτως, οι τιμές R^2 για τις εν λόγω προσαρμογές δεν είναι ικανοποιητικές. Όλα αυτά ερμηνεύονται με βάση την υποβάθμιση των χλωροφυλλών, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, σύμφωνα με

τον Hartmut K. Lichtenthaler (1987). Παρατηρώντας και τα τρία διαγράμματα μαζί, η επίδραση της επεξεργασίας των κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι εμφανέστατη και όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη. Για την θερμοκρασία εκχύλισης των 30°C η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορεί να μειώσει το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη κατά 10%. Πιο συγκεκριμένα σε αυτήν την θερμοκρασία, οι τιμές $\ln C_e$ των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με PEF και επωάστηκαν σε αιθανόλη 75% δεν διαφέρουν σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή των ανεπεξέργαστων κυττάρων που επωάστηκαν σε αιθανόλη 85%. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τις περιεκτικότητες 85 και 95% στους 30°C, και για όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες μεταξύ των περιεκτικότητων 85 και 95%.

Εν κατακλείδι, ο διαλύτης που περιέχει 75% αιθανόλη δεν προτιμάται, λόγω των χαμηλών αποδόσεων που οφείλονται στην χαμηλή διαλυτότητα των χλωροφυλλών στο νερό και λόγω της υποβάθμισής τους σε υψηλότερες θερμοκρασίες εκχύλισης. Η επεξεργασία με PEF αυξάνει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, καθώς και μπορεί να μειώσει το ποσοστό αιθανόλης κατά 10% ώστε να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα σε σχέση με το ανεπεξέργαστο υλικό στην ίδια θερμοκρασία. Τέλος, η επεξεργασία PEF600 επιλέγεται ως βέλτιστη συνθήκη παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, γιατί επιφέρει το βέλτιστο αποτέλεσμα με την μικρότερη παροχή ενέργειας.

Από τις κλίσεις των διαγραμμάτων υπολογίζεται και η ενέργεια ενεργοποίησης, η οποία δείχνει την εξάρτηση του φαινομένου της εκχύλισης από τη θερμοκρασία. Οι τιμές τους βρίσκονται συγκεντρωμένες στον **Πίνακα 5.6**.

Πίνακας 5.6 Ενέργεια ενεργοποίησης για κάθε κυτταρικό υλικό και διαλύτη της εκχύλισης.

Ea (kJ/mol)				
% Αιθανόλη	Control	PEF 300	PEF 600	PEF 1000
95	13.95 ± 2.2 ^{ab}	13.85 ± 0.4 ^{ab}	11.10 ± 2.0 ^{abc}	11.76 ± 1.6 ^{abc}
85	12.84 ± 3.6 ^{abc}	12.87 ± 1.4 ^{abc}	13.45 ± 2.2 ^{ab}	11.03 ± 3.0 ^{abc}
75	15.32 ± 3.8 ^b	8.58 ± 5.0 ^{cd}	6.70 ± 5.5 ^{cd}	6.82 ± 4.6 ^d

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± τυπική απόκλιση

Όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5.6**, οι διάφορες τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, δηλαδή η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη και η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία δε επιδρούν σημαντικά στην εξάρτηση της διεργασίας της εκχύλισης των χλωροφυλλών από την θερμοκρασία. Σχετικά με τις τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης, το γεγονός πως είναι μεγαλύτερες από 10 kJ/mol υποδεικνύει πως η επίδραση της θερμοκρασίας είναι σημαντική, παρατήρηση που επαληθεύει τα αποτελέσματα από την στατιστική επεξεργασία των τιμών C_e , η οποία σχολιάστηκε στην **Παράγραφο 5.2.3**. Σχετικά με τα E_a που προέκυψαν για τα C_e που αντιστοιχούν σε εκχυλίσαις με αιθανόλη 75%, δεν μπορούν να αξιολογηθούν, δεδομένων των μη αποδεκτών προσαρμογών της εξίσωσης Arrhenius, λόγω της υποβάθμισης των χλωροφυλλών.

5.2.9 Ανακεφαλαίωση

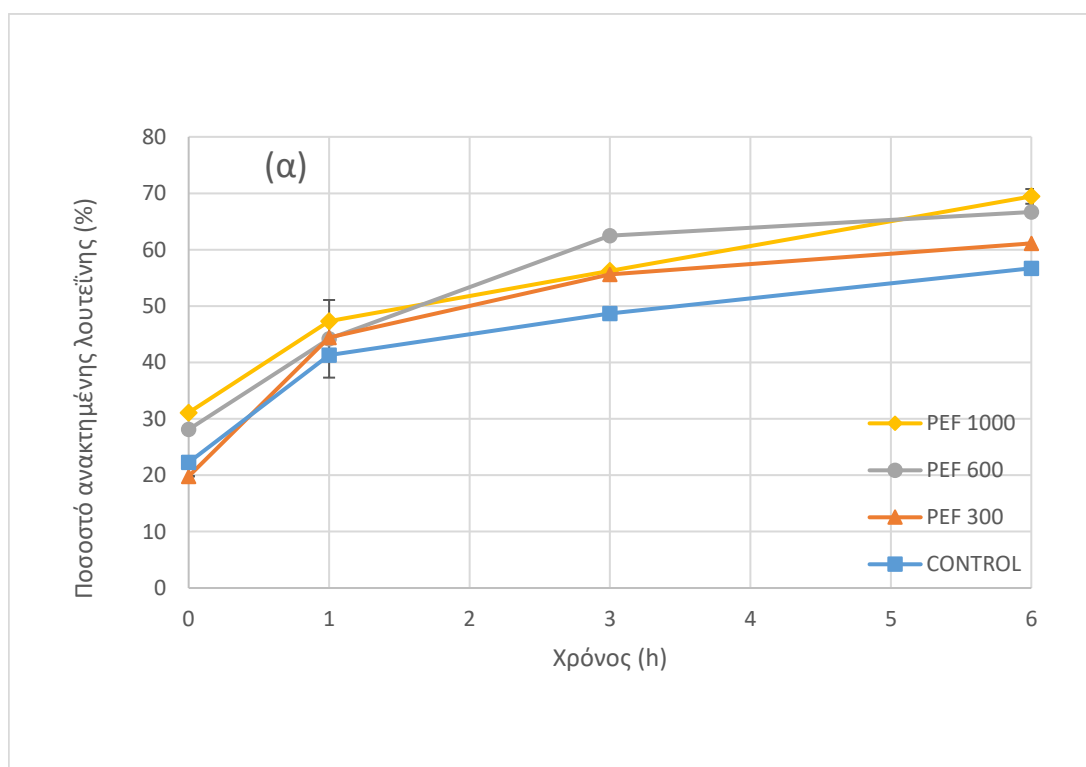
Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, μπορεί να προταθεί ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την επίτευξη της μέγιστης ανάκτησης χλωροφυλλών από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*, ο οποίος αποτελείται από την επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία PEF1000 σε θερμοκρασία εκχύλισης 60°C και χρήση διαλύτη 95% αιθανόλη, για την πλήρη ανάκτηση των χλωροφυλλών. Ωστόσο συγκριτικά με το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών από ανεπεξέργαστα κύτταρα (~80%) το οποίο επίσης παρατηρείται στους 60°C με χρήση αιθανόλης 95%, η εφαρμογή της συνθήκης PEF600 μπορεί να ελαττώσει είτε την θερμοκρασία εκχύλισης στους 45°C είτε το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη στο 85%, ώστε να επιτευχθεί η ίδια απόδοση.

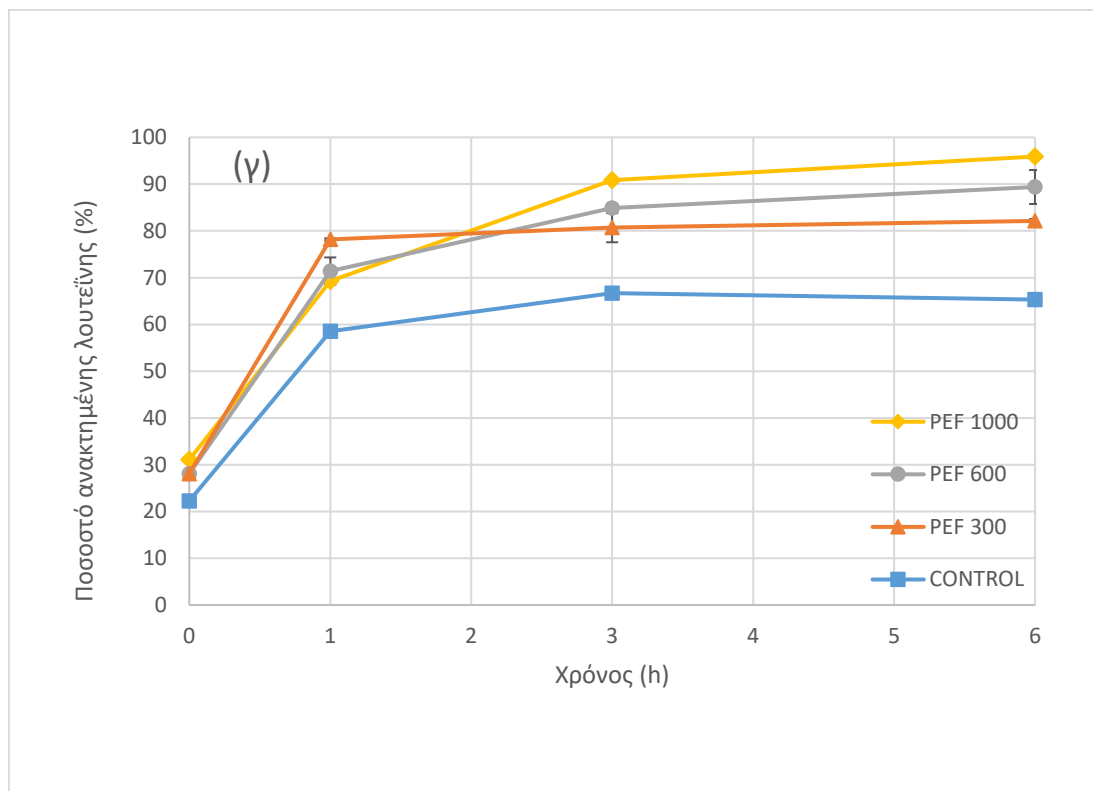
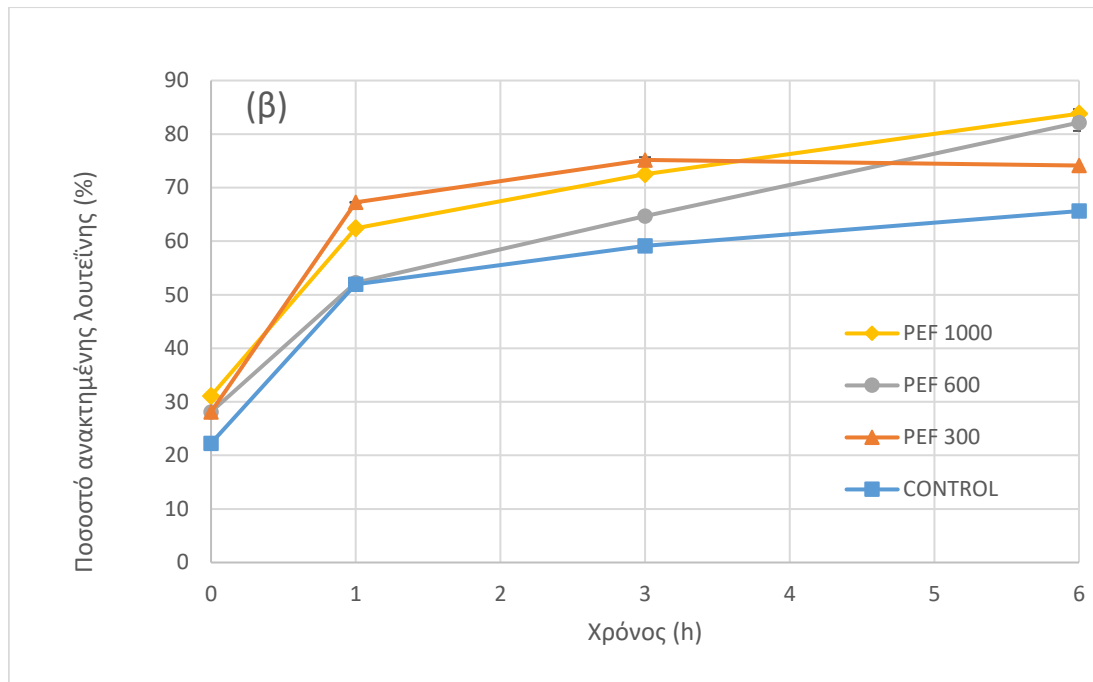
5.3 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην ανάκτηση της λουτεΐνης.

Η λουτεΐνη όπως είχε τονιστεί και στο **Κεφάλαιο 2**, είναι το βασικό καροτενοειδές του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Παρακάτω παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα διαγράμματα που αναπαριστούν το ποσοστό της ανακτημένης λουτεΐνης συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης και αναφέρεται η επίδραση κάθε μίας παραμέτρου.

5.3.1 Θερμοκρασία

Προκειμένου να σχολιαστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στο ποσοστό της ανακτημένης λουτεΐνης, παρατίθενται τα ακόλουθα διαγράμματα. Να τονιστεί ότι, και σε όλα τα παρακάτω διαγράμματα, τα σημεία τα οποία αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή $t = 0$, αναφέρονται πρακτικά στην απελευθέρωση της ενδοκυττάριας λουτεΐνης, τη στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία, ενώ σε ακριβή πειραματικό χρόνο παίρνουν την τιμή $t = \frac{5}{60} = 0.08 \text{ h}$, δηλαδή των 5 min.

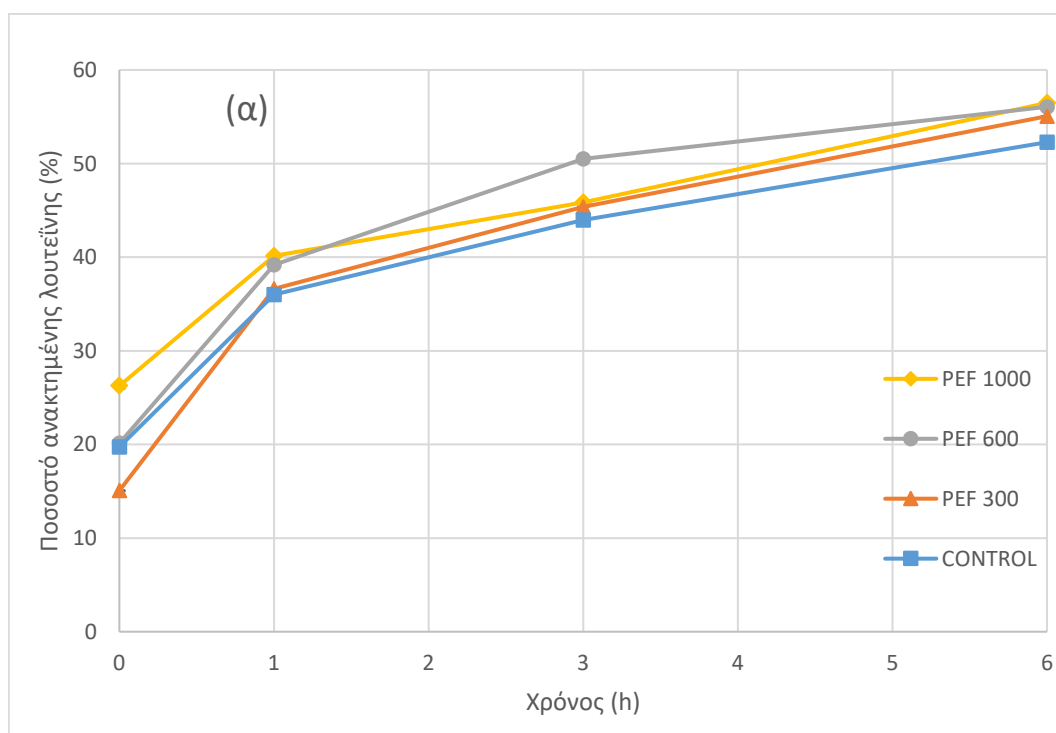


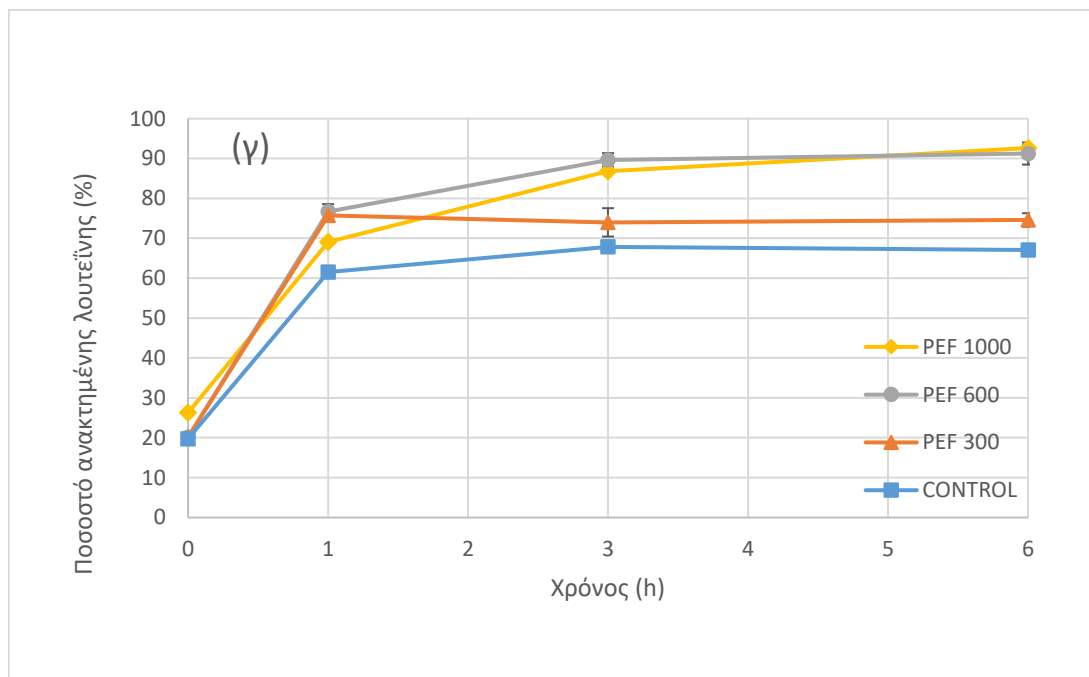
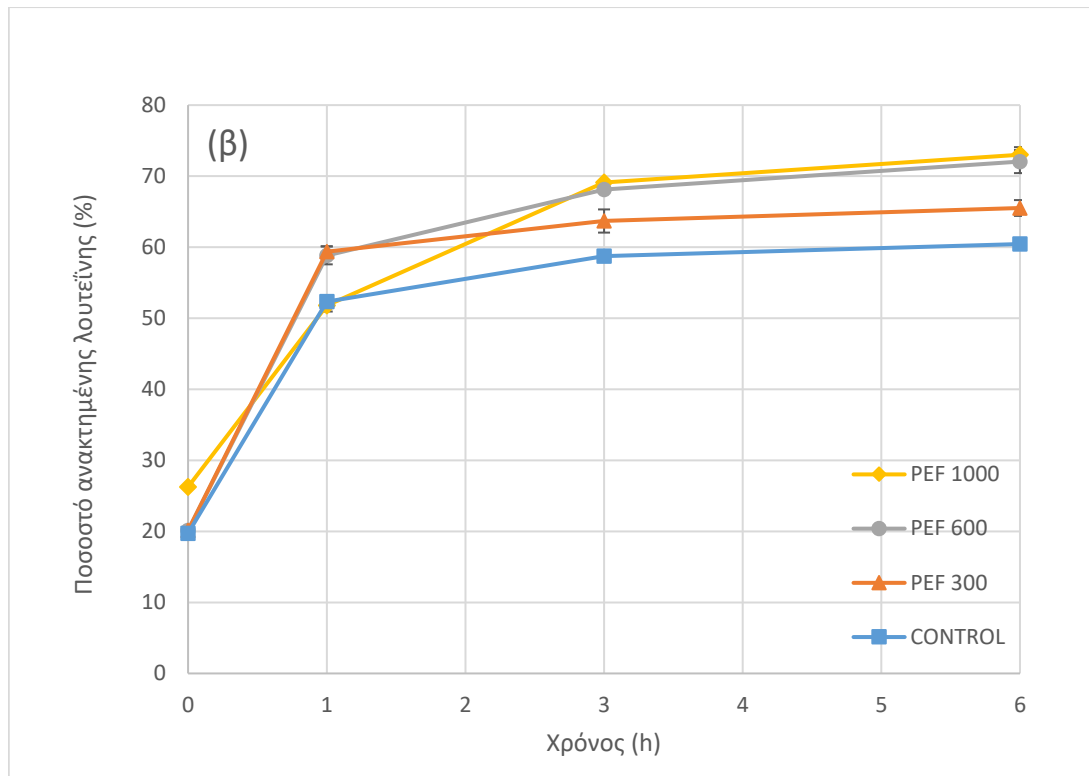


Διάγραμμα 5.6 Ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης για κάθε επεξεργασία, για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη 95 % v/v και για κάθε θερμοκρασία (α) 30°C, (β) 45°C και (γ) 60°C .

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 5.6**, παρατηρείται ότι για 95 % περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη, η επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι αρκετά σημαντική. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι η συνθήκη PEF1000 σε όλες τις περιπτώσεις θερμοκρασίας

είναι σημαντικά πιο πάνω από τις υπόλοιπες επεξεργασίες αλλά και από το ανεπεξέργαστο δείγμα. Στο **Διάγραμμα 5.6(γ)**, φαίνεται ότι έχει επιτευχθεί ποσοστό ανάκτησης 95 % συγκριτικά με το ανεπεξέργαστο δείγμα που έδωσε 65 % λουτεΐνης. Ήδη για χρόνο ίσο με 3 ώρες, έχει παραληφθεί στο εκχύλισμα 90 % λουτεΐνης από τη συνθήκη PEF300, σε σύγκριση με το ανεπεξέργαστο δείγμα που είχε 66 % λουτεΐνης. Σε αυτό βοηθάει και η θερμοκρασία καθώς στους 60°C, ευνοείται περισσότερο η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και η απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ουσιών, άρα και της λουτεΐνης. Αν συγκριθούν τα παραπάνω διαγράμματα ως προς τη θερμοκρασία, για τη χρονική στιγμή $t=3h$, όπου, το φαινόμενο έχει στην πραγματικότητα σταθεροποιηθεί, και σε συνθήκη 1000 παλμών, παρατηρείται ότι στους 60°C έχει ανακτηθεί το 90 %, στους 45°C το 75.2 %, ενώ στους 30°C το 57 %. Ακόμα, όμως, και στην πιο ήπια επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, όπου εφαρμόζονται 300 παλμοί ανακτάται ικανοποιητικό ποσοστό λουτεΐνης (80 %) στις 3 ώρες, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας από 30°C σε 60°C, οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και υψηλότερη εκχυλισιμότητα των καροτενοειδών, άρα και της λουτεΐνης.

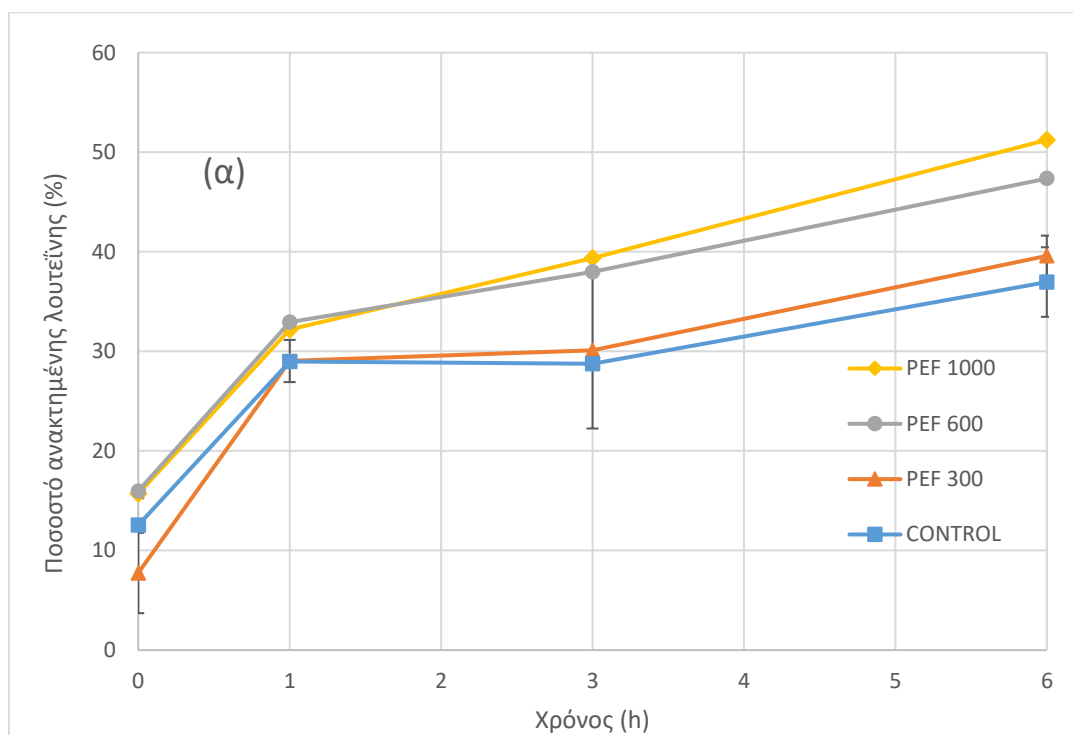


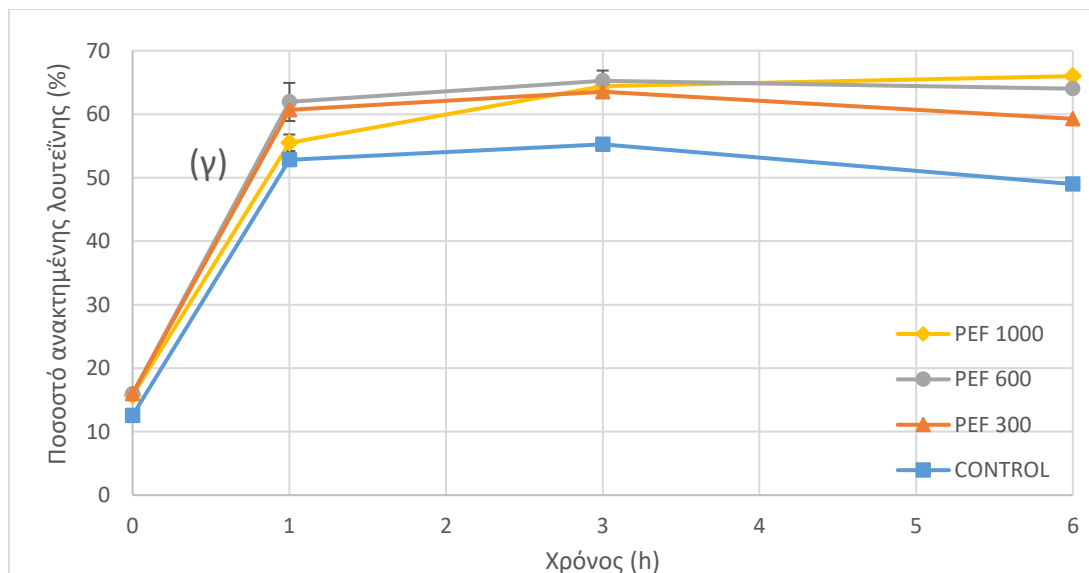
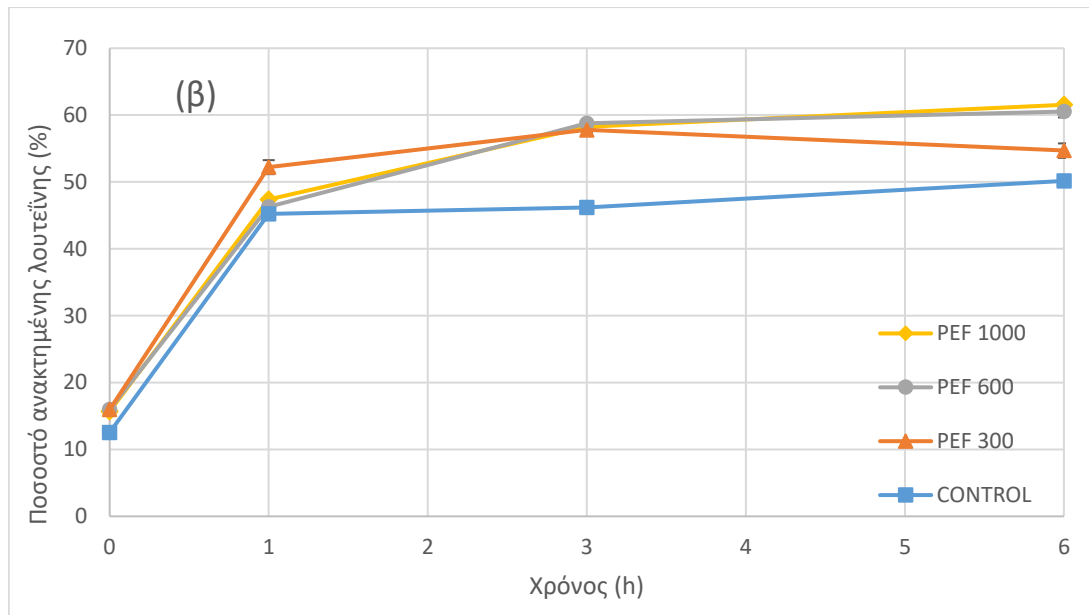


Διάγραμμα 5.7 Ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης για κάθε επεξεργασία, για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη 85 % v/v και για κάθε θερμοκρασία (α) 30°C, (β) 45°C και (γ) 60°C.

Με ανάγνωση του **Διαγράμματος 5.7**, παρατηρείται ότι για 85 % περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη, η επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι και σε αυτήν την συνθήκη, σημαντική. Ειδικότερα, όλες οι συνθήκες PEF, και στις τρεις θερμοκρασίες,

έχουν ξεπεράσει την καμπύλη των ανεπεξέργαστων δειγμάτων. Στο **Διάγραμμα 5.7(α)** φαίνεται ότι έχει επιτευχθεί ποσοστό ανάκτησης 52 % συγκριτικά με το ανεπεξέργαστο δείγμα που έδωσε 45 % λουτεΐνης, ήδη για χρόνο ίσο με 3 ώρες. Οι συνθήκες PEF300 και PEF600 συναγωνίζονται η μία την άλλη χωρίς όμως να απέχουν πολύ από την συνθήκη των υψηλότερων παλμών. Ενώ σε θερμοκρασία 30°C, όλες οι συνθήκες δίνουν σχεδόν ίδιο ποσοστό (50 %) ανακτημένης λουτεΐνης, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία οι συνθήκες PEF600 και PEF1000 είναι μετατοπισμένες προς τα πάνω. Συγκεκριμένα, στο **Διάγραμμα 5.7(β)** για t=3h, με τη συνθήκη PEF600 το ποσοστό της λουτεΐνης αυξήθηκε από 58 % των ανεπεξέργαστων κυττάρων σε 68 %, ενώ στο **Διάγραμμα 5.7(γ)**, παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση από 67 % των ανεπεξέργαστων σε 89 % με εφαρμογή 600 παλμών στην προκατεργασία της κυτταρικής ύλης.





Διάγραμμα 5.8 Ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης για κάθε επεξεργασία, για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη 75 % v/v και για κάθε θερμοκρασία (α) 30°C, (β) 45°C και (γ) 60°C.

Τέλος, στο **Διάγραμμα 5.8**, η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την κυτταρική διαπερατότητα σε συνεργασία, βέβαια και με τη διάρρηξη που έχουν προηγουμένως υποστεί τα κύτταρα της προς μελέτη βιομάζας. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από το **Διάγραμμα 5.8(γ)**, για χρόνο $t=3h$, όπου το φαινόμενο έχει σχεδόν σταθεροποιηθεί, στη συνθήκη PEF600 και σε θερμοκρασία 60°C, ανακτάται ποσοστό λουτεΐνης 65.2 %, σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα που δίνουν 55.2 % ανακτημένης λουτεΐνης την ίδια χρονική στιγμή. Για $T=45^\circ C$, οι συνθήκες PEF συναγωνίζονται η μία την άλλη. Ωστόσο, και πάλι η συνθήκη PEF600 έχει

αυξήσει το ποσοστό της λουτεΐνης από 46 % σε 57 %, ενώ στους 30°C έχει επιτευχθεί αύξηση από 33 % σε 37 %.

Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως, μελετώντας τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 45°C, αλλά και από τους 30°C στους 60°C, επιδρά σημαντικά στην αύξηση του ποσοστού της λουτεΐνης των εκχυλισμάτων, ενώ η αύξηση από τους 45°C στους 60°C δεν επιφέρει τόσο σημαντικές διαφορές.

5.3.2 Περιεκτικότητα % v/v σε Αιθανόλη

Αναφορικά με την περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη, φαίνεται ότι επιδρά σημαντικά στο ποσοστό ανάκτησης της λουτεΐνης, καθώς εκείνη είναι δυσδιάλυτη στο νερό. Έτσι, όταν αυξάνεται το ποσοστό του νερού στον διαλύτη που χρησιμοποιείται, η λουτεΐνη ανακτάται σε μικρότερο βαθμό. Επομένως, αυξανόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης, αυξάνεται το ποσοστό ανάκτησης της λουτεΐνης. Το μέγιστο ανάκτησης της λουτεΐνης σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας και θερμοκρασίας παρατηρείται σε 95 % v/v αιθανόλη.

5.3.3 Ανακεφαλαίωση

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, μπορεί να προταθεί ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών για την επίτευξη της μέγιστης ανάκτησης λουτεΐνης στο εκχύλισμα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, ο οποίος αποτελείται από την επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία PEF1000 σε θερμοκρασία εκχύλισης 60°C και χρήση διαλύτη 95% αιθανόλη, για την μέγιστη ανάκτηση της λουτεΐνης (~95 %). Ωστόσο συγκριτικά με το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης λουτεΐνης από ανεπεξέργαστα κύτταρα (~67%) το οποίο παρατηρείται στους 60°C με χρήση αιθανόλης 95%, η εφαρμογή της συνθήκης PEF300 μπορεί να ελαττώσει είτε την θερμοκρασία εκχύλισης στους 45°C, είτε το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη στο 85%, ώστε να επιτευχθεί η ίδια απόδοση. Επίσης, μπορεί να επιλεγεί η εφαρμογή 600 παλμών, με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 60°C και μείωση της περιεκτικότητας σε 75 % αιθανόλης v/v.

5.4 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην επιλεκτικότητα αυτής

5.4.1 Εκλεκτικότητα εκχύλισης ως προς τις χλωροφύλλες

Πίνακας 5.7 Λόγος Ca/Cβ, για όλες τις θερμοκρασίες, όλες τις περιεκτικότητες σε αιθανόλη στο διαλύτη της εκχύλισης, καθώς και όλες τις προεπεξεργασίες με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.

T=30°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	2.04 ± 0.09 ^{ijklm}	1.83 ± 0.01 ^{ghi}	1.55 ± 0.02 ^{cd}
PEF 300	2.04 ± 0.01 ^{ijklm}	1.78 ± 0.01 ^{fgh}	1.55 ± 0.01 ^{cd}
PEF 600	2.07 ± 0.01 ^{ijklmn}	1.98 ± 0.01 ^{jk}	1.55 ± 0.01 ^{cd}
PEF 1000	1.94 ± 0.01 ^{ij}	1.77 ± 0.01 ^{fgh}	1.45 ± 0.02 ^c
T=45°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	2.20 ± 0.01 ⁿ	2.00 ± 0.09 ^{jkl}	1.79 ± 0.01 ^{fgh}
PEF 300	2.10 ± 0.09 ^{klmn}	1.99 ± 0.03 ^{jkl}	1.53 ± 0.37 ^{cd}
PEF 600	2.02 ± 0.10 ^{ijklm}	1.84 ± 0.20 ^{hi}	1.77 ± 0.02 ^{fgh}
PEF 1000	2.14 ± 0.01 ^{lmn}	2.00 ± 0.01 ^{jkl}	1.74 ± 0.01 ^{efgh}
T=60°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	1.68 ± 0.01 ^{defg}	1.60 ± 0.02 ^{de}	1.30 ± 0.03 ^b
PEF 300	2.20 ± 0.07 ⁿ	2.05 ± 0.02 ^{ijklm}	1.68 ± 0.04 ^{def}
PEF 600	2.17 ± 0.01 ^{mn}	2.04 ± 0.01 ^{ijklm}	1.64 ± 0.04 ^{def}
PEF 1000	1.61 ± 0.08 ^{de}	1.55 ± 0.01 ^{cd}	1.15 ± 0.03 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Στον **Πίνακα 5.7**, παρατίθενται τα αποτελέσματα του λόγου $\frac{C_a}{C_b}$, όπου C_b είναι το εμβαδό που αντιστοιχεί στην δεύτερη κορυφή του χρωματογραφήματος που λήφθηκε, από την συσκευή της υγρής χρωματογραφίας, στα 443 nm και C_a το εμβαδόν της τρίτης κορυφής του ίδιου χρωματογραφήματος. Με αυτόν τον τρόπο, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα της εκχύλισης μεταξύ των χλωροφυλλών α και β μεταξύ τους.

Διαβάζοντας τον παραπάνω **Πίνακα 5.7** οριζόντια, παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης επιδρά σημαντικά στον λόγο αυτό. Πιο συγκεκριμένα, μειωνόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, ο λόγος μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης β, στο ανακτημένο εκχύλισμα περιεκτικότητας 85 % σε αιθανόλη, αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την ποσότητα της χλωροφύλλης β στο εκχύλισμα περιεκτικότητας 95 % σε αιθανόλη. Όπως έχει προαναφερθεί στο Κεφάλαιο 2, στη χλωροφύλλη β, η μεθυλομάδα της χλωροφύλλης α, αντικαθίσταται από μία φορμυλομάδα (-CHO), καθιστώντας, με αυτόν τον τρόπο, την χλωροφύλλη β πιο ευδιάλυτη στο νερό.

Η κάθετη ανάγνωση του **Πίνακα 5.7**, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές του λόγου αυτού, δηλώνοντας πως η προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, όπως και η θερμοκρασία δεν επιδρούν σημαντικά στην επιλεκτικότητα της εκχύλισης ως προς τις δύο ειδών χλωροφύλλες.

Εξάιρεση αποτελεί η συνθήκη PEF600, θερμοκρασίας $T = 30^\circ\text{C}$ και περιεκτικότητας 85 % v/v σε αιθανόλη, όπου φαίνεται ότι ο λόγος έχει αυξηθεί από 1.83 ± 0.01 , του ανεπεξέργαστου δείγματος, σε 1.98 ± 0.01 .

Παρατηρείται ακόμη, ότι στους 60°C , σε περιεκτικότητα αιθανόλης 75 % κατ' όγκο, ο λόγος μειώνεται σημαντικά, στη συνθήκη PEF1000, λαμβάνοντας την τιμή 1.15 ± 0.03 . Αυτό συμβαίνει λόγω της καταπόνησης των χλωροφυλλών, και της υποβάθμισης που αυτές υφίστανται εξαιτίας της παρουσίας νερού και της θερμότητας που αποδίδεται από την συγκεκριμένη μέθοδο διάρρηξης των κυττάρων.

Σε κάθε περίπτωση, όμως, η γενική εικόνα δείχνει αύξηση της χλωροφύλλης β όσο αυξάνεται το ποσοστό του νερού του διαλύτη της εκχύλισης.

5.4.2 Εκλεκτικότητα εκχύλισης της λουτεΐνης ως προς τις χλωροφύλλες

Πίνακας 5.8 Λόγος λουτεΐνης / ολικές χλωροφύλλες, για όλες τις θερμοκρασίες, όλες τις περιεκτικότητες σε αιθανόλη στο διαλύτη της εκχύλισης, καθώς και όλες τις προεπεξεργασίες με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

T=30°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	0.66 ± 0.01 ^{cd}	0.75 ± 0.01 ^e	1.02 ± 0.03 ^{jk}
PEF 300	0.66 ± 0.01 ^{gh}	0.88 ± 0.01 ^{gh}	0.87 ± 0.22 ^{cd}
PEF 600	0.65 ± 0.01 ^{bcd}	0.73 ± 0.01 ^{def}	0.99 ± 0.01 ^{ij}
PEF 1000	0.67 ± 0.01 ^{cd}	0.76 ± 0.01 ^e	1.07 ± 0.01 ^k
T=45°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	0.55 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.02 ^{abc}	0.84 ± 0.01 ^g
PEF 300	0.57 ± 0.01 ^{ab}	0.67 ± 0.03 ^{cdf}	0.75 ± 0.11 ^{ef}
PEF 600	0.66 ± 0.02 ^{cd}	0.67 ± 0.01 ^{cd}	0.87 ± 0.01 ^{gh}
PEF 1000	0.57 ± 0.01 ^{ab}	0.64 ± 0.01 ^{bc}	0.86 ± 0.01 ^{gh}
T=60°C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	0.57 ± 0.01 ^{ab}	0.63 ± 0.01 ^{abc}	0.93 ± 0.02 ^{hi}
PEF 300	0.55 ± 0.01 ^a	0.65 ± 0.02 ^{bcd}	0.98 ± 0.02 ^{ij}
PEF 600	0.55 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.02 ^{abc}	1.02 ± 0.01 ^{jk}
PEF 1000	0.61 ± 0.02 ^{abc}	0.67 ± 0.01 ^{cd}	1.07 ± 0.03 ^k

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Στον **Πίνακα 5.8**, παρατίθενται τα αποτελέσματα του λόγου $\frac{I_{ut}}{C_{\alpha} + C_{\beta}}$, όπου I_{ut} είναι το εμβαδό που αντιστοιχεί στην πρώτη κορυφή του χρωματογραφήματος που λήφθηκε, από την συσκευή της υγρής χρωματογραφίας, στα 443 nm και C_{α} και C_{β} το εμβαδόν της δεύτερης και τρίτης κορυφής του ίδιου χρωματογραφήματος. Με αυτόν τον τρόπο, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα της εκχύλισης ως προς τη λουτεΐνη έναντι των χλωροφυλλών.

Διαβάζοντας τον παραπάνω **Πίνακα 5.8** οριζόντια, παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης επιδρά σημαντικά στον λόγο αυτό. Πιο συγκεκριμένα, μειωνόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, ο λόγος αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει γιατί η λουτεΐνη είναι περισσότερο ευδιάλυτη στο νερό απ' ό,τι οι χλωροφύλλες. Επίσης, αυτό εξηγείται όπως προαναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, διότι οι χλωροφύλλες, σε ποσοστό νερού μεγαλύτερου του 10 %, υποβαθμίζονται και μετατρέπονται σε φαιοφυτίνες. Έτσι, η λουτεΐνη αυξάνεται ως προς τις χλωροφύλλες και έτσι το κλάσμα, όσο μειώνεται η περιεκτικότητα σε αιθανόλη μειώνεται.

Η κάθετη ανάγνωση του **Πίνακα 5.8**, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές του λόγου αυτού, δηλώνοντας πως η προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, όπως και η θερμοκρασία δεν επιδρούν σημαντικά στην επιλεκτικότητα της εκχύλισης ως προς τη λουτεΐνη έναντι των χλωροφυλλών.

Παρατηρείται ακόμη, ότι στους 60°C, σε περιεκτικότητα αιθανόλης 75 % κατ' όγκο, ο λόγος αυξάνεται σημαντικά, φτάνοντας την τιμή 1.07 ± 0.03 στη συνθήκη PEF 1000 σε θερμοκρασία 60°C. Αυτό συμβαίνει λόγω της καταπόνησης των χλωροφυλλών, και της υποβάθμισης που αυτές υφίστανται εξαιτίας της παρουσίας νερού και της θερμότητας που αποδίδεται από την συγκεκριμένη μέθοδο διάρρηξης των κυττάρων, οπότε η λουτεΐνη είναι κυρίαρχη στο εκχύλισμα που παραλαμβάνεται.

Σε κάθε περίπτωση, όμως, η γενική εικόνα δείχνει ότι στην περιεκτικότητα 75 % η ποσότητα της ανακτημένης λουτεΐνης έχει αυξηθεί σε σύγκριση με την αντίστοιχη ποσότητα αυτής στο εκχύλισμα στο οποίο είχε γίνει χρήση διαλύτη 95 % v/v σε αιθανόλη, σε κάθε επεξεργασία και θερμοκρασία στην οποία εκχυλίζεται το κυτταρικό αιώρημα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*.

5.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί χρονική εξέλιξη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων έγινε χρήση του παρακάτω μοντέλου (4.8):

$$TEAC = TEAC_e - (TEAC_e - TEAC_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{TEAC}}}$$

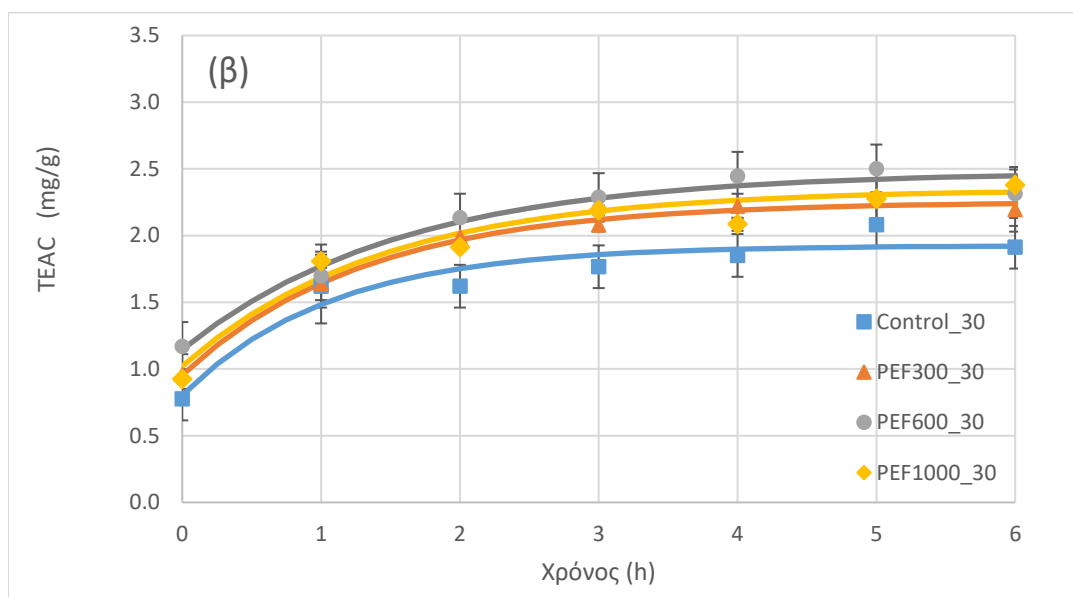
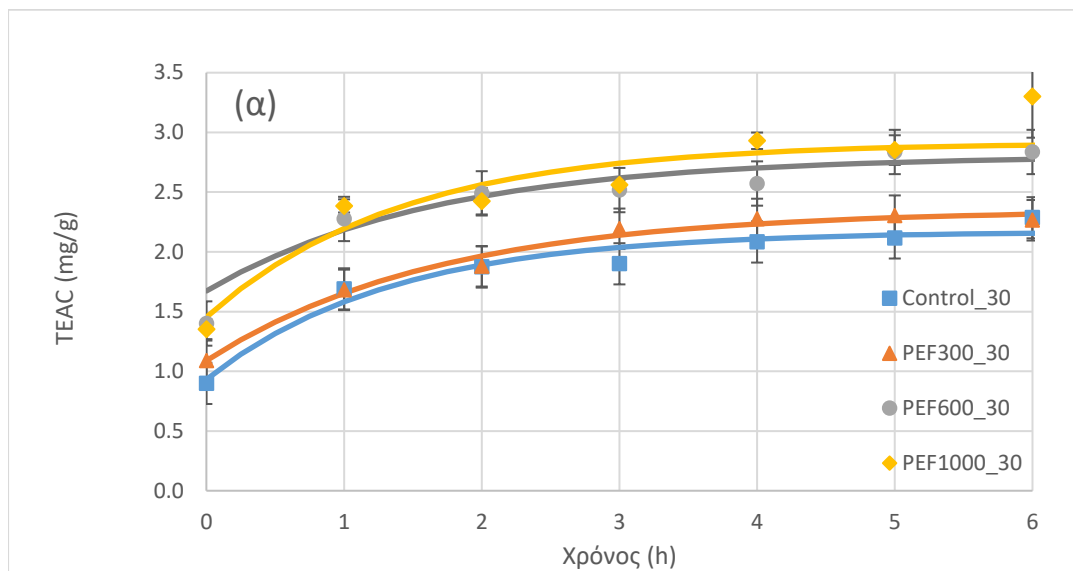
Ως $TEAC_e$, ορίζεται σε αυτήν την περίπτωση η τελική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, ως $TEAC_0$ η αρχική συγκέντρωση αυτών και σαν τ_{TEAC} , θεωρείται ο χρόνος κατά τον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3 % του φαινομένου της εκχύλισης. Αυτό το μοντέλο επιλέχθηκε έναντι άλλων γιατί εκτός από τα ελάχιστα σφάλματα, που προέκυψαν, έδωσε και τις βέλτιστες γραμμικές προσαρμογές, καθώς το R^2 ήταν πολύ κοντά στο 1.

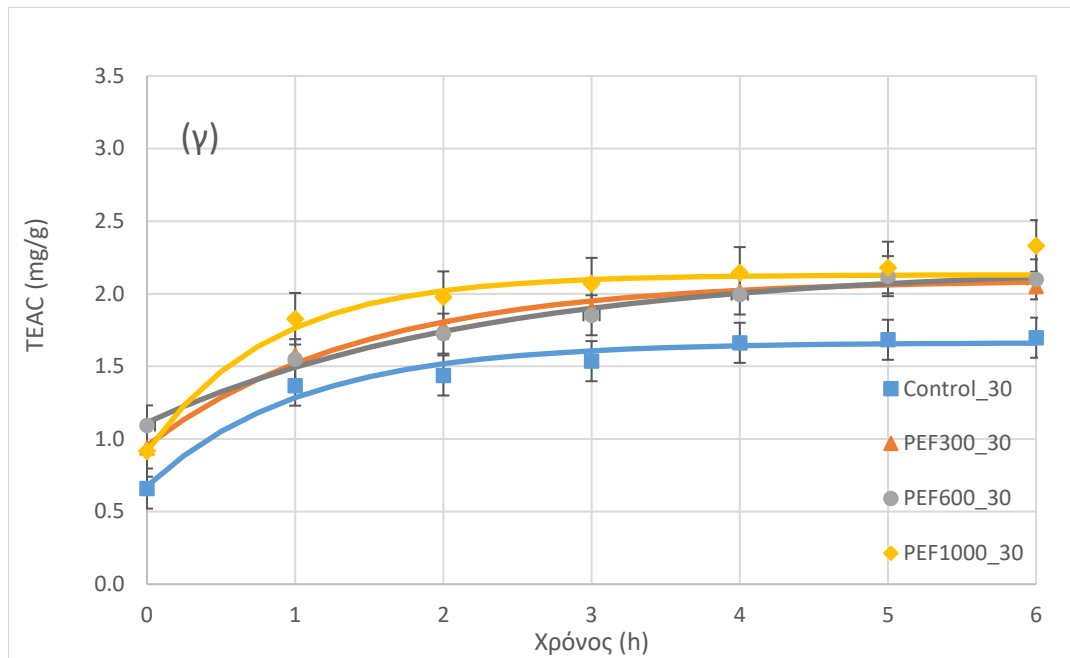
5.5.1 Μοντελοποίηση και μελέτη της χρονικής εξέλιξης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, το μαθηματικό μοντέλο $TEAC = TEAC_e - (TEAC_e - TEAC_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{TEAC}}}$ προσφέρει μια ικανοποιητική περιγραφή της κινητικής της χρονικής εξέλιξης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα των πρωτογενών δεδομένων που περιγράφουν την εξέλιξη της εκχύλισης για κάθε συνθήκη (επεξεργασία, θερμοκρασία εκχύλισης, περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη), ενώ στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου ακολουθεί η παρουσίαση και ο σχολιασμός των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

Για τον υπολογισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, οι μετρήσεις απορρόφησης εκφράστηκαν σε ισοδύναμα trolox, με χρήση της καμπύλης αναφοράς, όπως περιγράφηκε στο **Κεφάλαιο 4**. Έπειτα αφού εκφράστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε mg ισοδύναμων trolox, ανά g ξηρής βιομάζας κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας συναρτήσει του χρόνου, όπως φαίνεται παρακάτω.

Να τονιστεί ότι, και σε όλα τα παρακάτω διαγράμματα της **Ενότητας 5.5.1**, τα σημεία τα οποία αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή $t = 0$, αναφέρονται πρακτικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, τη στιγμή που γίνεται η δειγματοληψία, ενώ σε ακριβή πειραματικό χρόνο παίρνουν την τιμή $t = \frac{5}{60} = 0.08 \text{ h}$, δηλαδή των 5 min.

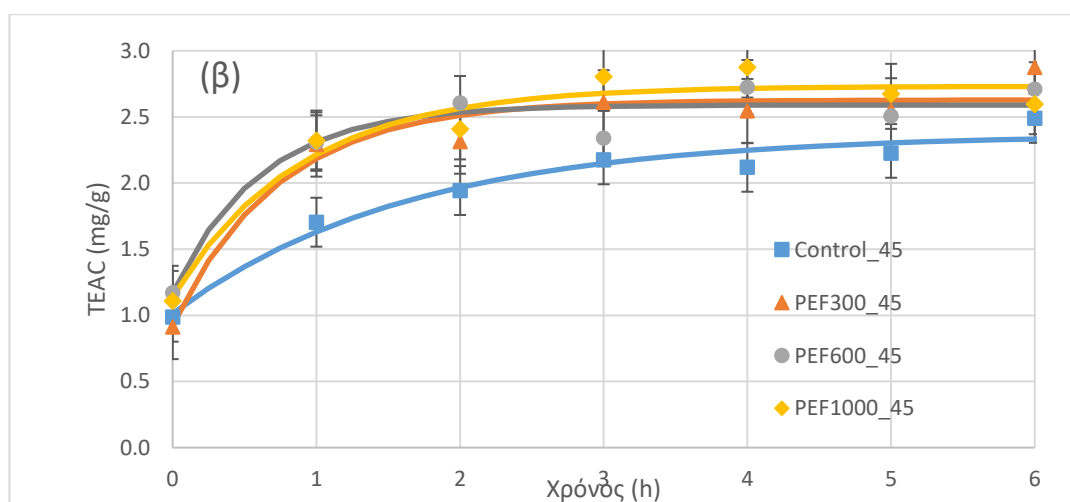
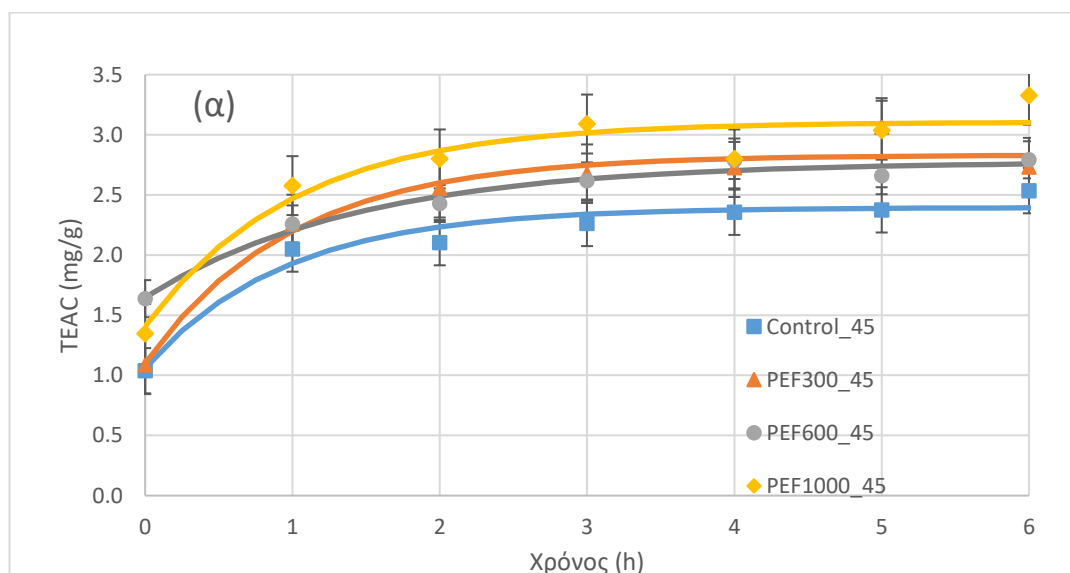


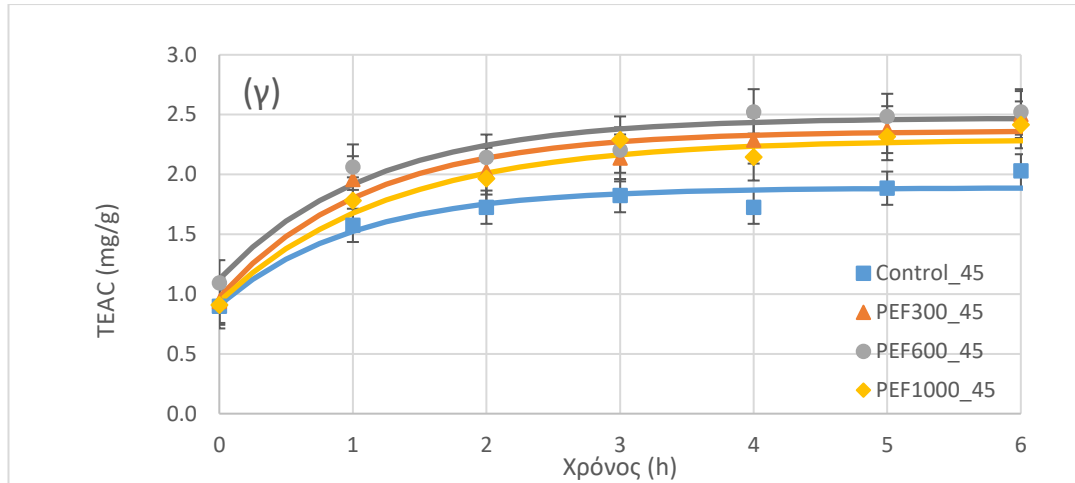


Διάγραμμα 5.9 Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mg trolox/g ξηρής βιομάζας συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 30°C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v

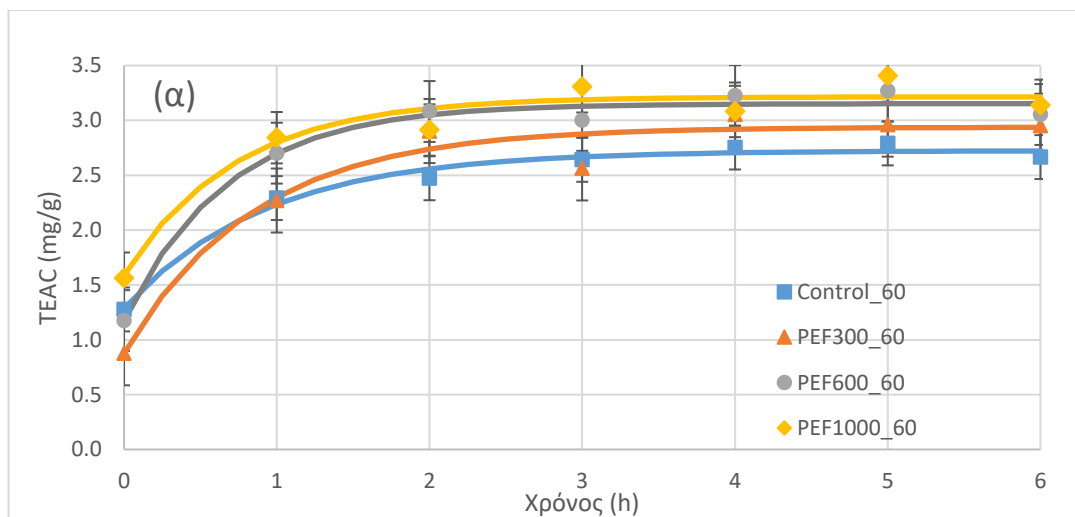
Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 5.9**, η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στα κύτταρα του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* επιφέρει σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ακόμη και από την έναρξη της διεργασίας της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, η συνθήκη PEF600 επιφέρει μία αρχική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από $0.7 \frac{mg}{g}$ σε $1.1 \frac{mg}{g}$ σε σχέση με την περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων για θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C και χρήση διαλύτη 75% v/v σε αιθανόλη. Σε κάθε περίπτωση, τα σημεία που αντιστοιχούν στα επεξεργασμένα κύτταρα είναι πάνω από τα αντίστοιχα σημεία που αντιστοιχούν στα μη επεξεργασμένα, οδηγώντας σε μεγαλύτερες αποδόσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και της μεμβράνης των χλωροπλαστών των κυττάρων, εντός των οποίων περιέχονται οι ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Βάσει του **Διαγράμματος 5.9(α)**, η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα από $1.3 \frac{mg}{g}$ σε $3.3 \frac{mg}{g}$ την χρονική στιγμή των 6 h εκχύλισης. Ωστόσο, η τάση των σημείων μεταξύ των διαφόρων επεξεργασιών δεν φαίνεται να επηρεάζεται, γεγονός που δηλώνει πως η διεργασία της εκχύλισης δεν επιταχύνεται σημαντικά με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων. Επιπλέον, μεταξύ των τριών διαγραμμάτων, παρατηρείται πως η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη επιφέρει

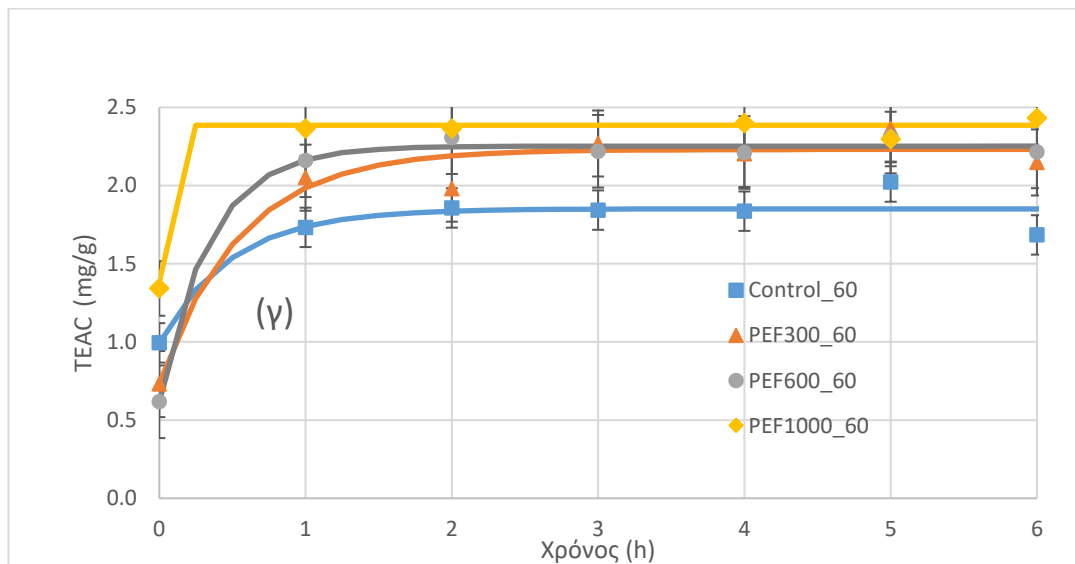
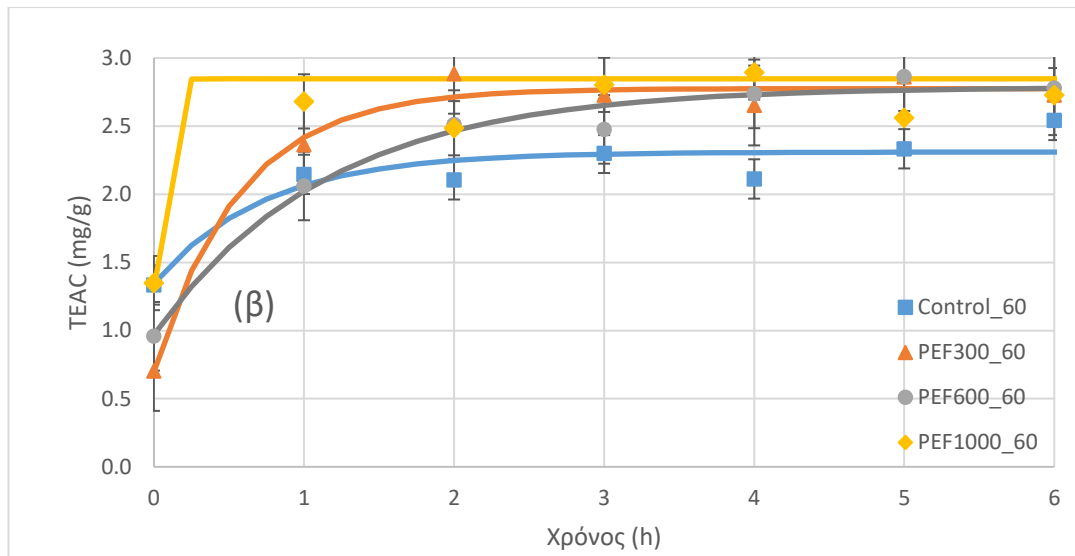
σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των ίδιων επεξεργασιών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων, η μείωση του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη από 95% σε 75% v/v επιφέρει ελάττωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έως και 35 %, λόγω της αδιαλυτότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών στο νερό. Ωστόσο, με την εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορούν να επιτευχθούν αντίστοιχες αποδόσεις με εκείνες των ανεπεξέργαστων κυττάρων, μειώνοντας το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη. Για παράδειγμα, συγκρίνοντας τα **Διαγράμματα 5.9(α)** και **5.9(β)** παρατηρείται πως ύστερα από 6 h εκχύλισης η εφαρμογή της συνθήκης PEF1000 επιφέρει παραπλήσια αντιοξειδωτική ικανότητα (~ 3 mg/g) χρησιμοποιώντας αιθανόλη 85% v/v, σε σχέση με την χρήση ανεπεξέργαστων κυττάρων και διαλύτη 95% v/v.





Διάγραμμα 5.10 Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mg τροlox/g ξηρής βιομάζας συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 45°C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v





Διάγραμμα 5.11. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mg trolox/g ξηρής βιομάζας συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης για ανεπεξεργαστα και επεξεργασμένα κύτταρα σε θερμοκρασία εκχύλισης 45°C και για περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95% v/v (β) 85% v/v (γ) 75% v/v

Όπως φαίνεται στα παραπάνω **Διαγράμματα 5.10** και **5.11**, σε όλες τις συνθήκες, θερμοκρασίες και περιεκτικότητες, καθώς και σε όλες τις επιμέρους επεξεργασίες, το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί σχεδόν ήδη από το τρίωρο. Στη συνέχεια παρατηρείται μια σταθεροποίηση της συγκέντρωσης τους. Είναι φανερό ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιστοιχεί στους υψηλότερους παλμούς της επεξεργασίας με τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στο control είναι αισθητά πιο κάτω. Επίσης στους 600 και 1000 παλμούς, τα σφάλματα αλληλεπικαλύπτονται, άρα η πορεία που ακολουθούν είναι σχεδόν

η ίδια. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς δίνει τη δυνατότητα της μείωσης των παλμών της επεξεργασίας, γεγονός που συνεπάγεται και την εξοικονόμηση της ενέργειας που δαπανάται κατά τη διάρκεια του φαινομένου της εκχύλισης. Μειωμένης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύτη της εκχύλισης, παρατηρούμε ότι η συνθήκη των 600 παλμών έχει σχεδόν ξεπεράσει τους 1000, με όλες όμως τις καμπύλες που αντιστοιχούν στις επεξεργασίες με PEF να βρίσκονται πιο πάνω από το ανεπεξέργαστο δείγμα. Τέλος, στους 30°C, με περιεκτικότητα αιθανόλης 75 % παρατηρείται ίδια συμπεριφορά των καμπύλων των προεπεξεργασμένων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία κυττάρων, με την καμπύλη των 1000 παλμών να έχει μεγαλύτερη κλίση. Και πάλι η δράση του PEF οδηγεί σε υψηλότερες του ανεπεξέργαστου δείγματος συγκεντρώσεις.

Συγκεκριμένα, στους 45 °C, η συνθήκη PEF1000 οδηγεί σε παραπλήσια αντιοξειδωτική ικανότητα, περίπου 3 mg trolox/g ξηρής βιομάζας, παρά τη μείωση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη από 95% σε 85% v/v. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας, παρατηρείται ότι και πάλι η προεπεξεργασία της ξηρής κυτταρικής βιομάζας με τους παλμούς ρυθμισμένους στους 1000 οδηγεί σε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στους 60°C παρατηρείται και πάλι ολοκλήρωση του φαινομένου στις 6 ώρες. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται απότομη αύξηση της ικανότητας αυτής και σταθεροποίησή της από τη μία κιόλας ώρα. Όπως φαίνεται και στα παραπάνω διαγράμματα, στη χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη στους 600 παλμούς η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων είναι υψηλότερη, οδηγώντας έτσι το φαινόμενο της εκχύλισης να πραγματοποιείται στο μικρότερο χρόνο, με το ελάχιστο δυνατό κόστος.

5.5.2 Μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα ($TEAC_e$)

Πίνακας 5.9 Μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα (mg trolox / g ξηρής βιομάζας) από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης

CONTROL			
	T= 30 °C	T= 45°C	T= 60°C
95 % Αιθανόλη	2.17 ± 0.07 ^{cde}	2.39 ± 0.05 ^{ij}	2.72 ± 0.05 ^{mn}
85 % Αιθανόλη	1.92 ± 0.06 ^b	2.37 ± 0.11 ^{ghij}	2.31 ± 0.07 ^{fghi}
75 % Αιθανόλη	1.66 ± 0.03 ^a	1.89 ± 0.07 ^b	1.85 ± 0.14 ^b
PEF 300			
	30 °C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	2.35 ± 0.07 ^{ghij}	2.83 ± 0.06 ^{nop}	2.94 ± 0.07 ^p
85 % Αιθανόλη	2.25 ± 0.07 ^{defgh}	2.63 ± 0.07 ^{lm}	2.78 ± 0.06 ⁿ
75 % Αιθανόλη	2.10 ± 0.04 ^c	2.36 ± 0.06 ^{ghij}	2.23 ± 0.05 ^{defg}
PEF 600			
	30 °C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	2.80 ± 0.12 ^{no}	2.78 ± 0.05 ⁿ	3.15 ± 0.12 ^q
85 % Αιθανόλη	2.48 ± 0.12 ^{jk}	2.59 ± 0.06 ^{kl}	2.79 ± 0.08 ^{no}
75 % Αιθανόλη	2.19 ± 0.06 ^{cdef}	2.47 ± 0.07 ^{jk}	2.25 ± 0.02 ^{defgh}
PEF 1000			
	30 °C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	2.91 ± 0.09 ^{op}	3.11 ± 0.06 ^q	3.22 ± 0.04 ^q
85 % Αιθανόλη	2.35 ± 0.07 ^{ghij}	2.73 ± 0.04 ^{mn}	2.85 ± 0.07 ^{nop}
75 % Αιθανόλη	2.13 ± 0.04 ^{cd}	2.29 ± 0.05 ^{efghi}	2.39 ± 0.05 ^{hij}

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.9** οριζοντίως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, εξαιρώντας τους 60 °C για 75% αιθανόλη, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30°C στους 45°C ή από τους 30 °C στους 60 °C, επιδρά σημαντικά στην αύξηση της μέγιστης αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 30 σε 60°C με χρήση αιθανόλης 95% αύξησε τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 25% στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων και κατά 26% στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων PEF300. Ωστόσο, η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 45°C στους 60°C, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 30°C, όμως αυξάνει, την εκχυλισσιμότητα των συστατικών αυτών, καθώς η μεμβράνη και το τοίχωμα των κυττάρων γίνονται πιο διαπερατά και η κινητική των μορίων αυξάνεται. Σχετικά με τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 60°C με χρήση αιθανόλης 75%, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για την συνθήκη PEF300, ενώ για τις συνθήκες PEF600 και PEF1000 παρατηρείται σημαντική μείωση της ποσότητας TEAC_e, σε σχέση με τους 45°C. Σύμφωνα με τον Hartmut K. Lichtenthaler (1987) η παρατεταμένη έκθεση των αντιοξειδωτικών σε υψηλές θερμοκρασίες και η παραμονή, ή αποθήκευσή τους σε διαλύτες οι οποίοι περιέχουν ποσοστό νερού μεγαλύτερο από 10%, ευνοούν την υποβάθμισή τους, καθώς υφίστανται αυτό-οξειδωση, οξειδώνονται δηλαδή αυτά προκειμένου να προστατεύσουν άλλα βιοδραστικά ζωτικής σημασίας για το κύτταρο συστατικά. Επομένως, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης στους 60°C σε 75% αιθανόλη πιθανότατα αυξάνει την εκχυλισσιμότητά τους όπως και στις υπόλοιπες περιπτώσεις, αλλά παράλληλα προκαλεί και έντονη υποβάθμισή αυτών, η οποία οδηγεί σε μειωμένες τιμές TEAC_e.

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.9** καθέτως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης, συμπεραίνεται πως και η περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, εφόσον ούτε σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των TEAC_e. Για τις θερμοκρασίες εκχύλισης 30 και 45°C η αύξηση της αιθανόλης του διαλύτη από 75 σε 95% v/v επιφέρει

αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έως και 26 %, ενώ στους 60°C η αύξηση του TEAC_e αγγίζει το 29% στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με τη συνθήκη PEF1000. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται με βάση την ευδιαλυτότητα των αντιοξειδωτικών στην αιθανόλη, ενώ στους 60°C η εντονότερη αύξηση του TEAC_e εικάζεται πως οφείλεται στις μειωμένες τιμές TEAC_e λόγω υποβάθμισής τους στην χαμηλή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης, όπως περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο.

Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω σχολιασμός με ανάγνωση του **Πίνακα 5.9** διαγωνίως. Έτσι παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί ελάττωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη, ώστε να επιτευχθούν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές της μέγιστης ποσότητας ανάκτησης, και αντιστρόφως. Για παράδειγμα στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με PEF300 οι τιμές TEAC_e για εκχύλιση στους 45°C και σε αιθανόλη 85 και 75% δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για εκχύλιση στους 30°C και σε αιθανόλη 95 και 85%. Ο σχηματισμός πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και στην μεμβράνη των χλωροπλαστών των κυττάρων λόγω της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία ερμηνεύει αυτό το αποτέλεσμα, εφόσον τα μόρια των χρωστικών αυτών μπορούν ευκολότερα να διαπεράσουν τα εμπόδια των κυττάρων και να μεταφερθούν στην φάση του διαλύτη.

Τέλος, εξετάζοντας την επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παρατηρείται πως για δεδομένη θερμοκρασία εκχύλισης μπορεί να μειωθεί το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη, ώστε να επιτευχθούν αντίστοιχες αποδόσεις. Για παράδειγμα η εφαρμογή οποιασδήποτε συνθήκης PEF επιτυγχάνει ελάττωση της αιθανόλης από 95 σε 85% για εκχυλίσεις στους 30°C σε σχέση με κύτταρα Control. Επίσης οι συνθήκες PEF600 και PEF1000 επιφέρουν το ίδιο αποτέλεσμα σε σχέση με τα κύτταρα Control στους 45°C, ελαττώνοντας την αιθανόλη από 95 σε 85%.

5.5.3 Αρχική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ($TEAC_0$)

Πίνακας 5.10 Αρχική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (mg trolox/g ξηρής βιομάζας) από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης.

CONTROL			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	0.93 ± 0.21 ^{abcde}	1.06 ± 0.20 ^{abcdef}	1.29 ± 0.20 ^{cdefghi}
85 % Αιθανόλη	0.80 ± 0.21 ^{abc}	1.01 ± 0.25 ^{abcdef}	1.35 ± 0.28 ^{defghi}
75 % Αιθανόλη	0.68 ± 0.1 ^{ab}	0.91 ± 0.27 ^{abcde}	0.99 ± 0.64 ^{abcdef}
PEF 300			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.09 ± 0.15 ^{abcdefg}	1.10 ± 0.24 ^{abcdefg}	0.88 ± 0.28 ^{abcd}
85 % Αιθανόλη	0.95 ± 0.20 ^{abcdef}	0.93 ± 0.31 ^{abcde}	0.70 ± 0.28 ^{ab}
75 % Αιθανόλη	0.95 ± 0.11 ^{abcdef}	0.97 ± 0.21 ^{abcdef}	0.74 ± 0.21 ^{ab}
PEF 600			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.67 ± 0.27 ⁱ	1.65 ± 0.13 ^{hi}	1.18 ± 0.52 ^{bcdefgh}
85 % Αιθανόλη	1.15 ± 0.29 ^{bcdefg}	1.17 ± 0.25 ^{bcdefgh}	0.97 ± 0.29 ^{abcdef}
75 % Αιθανόλη	1.11 ± 0.08 ^{bcdefg}	1.13 ± 0.23 ^{bcdefg}	0.62 ± 0.1 ^a
PEF 1000			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.45 ± 0.27 ^{fghi}	1.41 ± 0.20 ^{efghi}	1.59 ± 0.17 ^{ghi}
85 % Αιθανόλη	1.02 ± 0.20 ^{abcdef}	1.14 ± 0.16 ^{bcdefg}	1.31 ± 0.35 ^{cdefghi}
75 % Αιθανόλη	0.92 ± 0.17 ^{abcde}	0.94 ± 0.15 ^{abcdef}	1.38 ± 0.27 ^{defghi}

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.10** οριζοντίως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, εξαιρώντας τους 60 °C για 75% αιθανόλη, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της αρχικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 30 σε 60°C με χρήση αιθανόλης 95% αύξησε την αρχική αντιοξειδωτική του ικανότητα κατά 38.7 % στην περίπτωση των ανεπεξεργαστων κυττάρων και κατά 9.6 % στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων PEF1000. Το γεγονός αυτό της μικρότερης αύξησης της αρχικής συγκέντρωσης στα επεξεργασμένα κύτταρα με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, δείχνει ότι η επίδραση αυτής της μεθόδου κυτταρικής διάρρηξης στο χρόνο μηδέν, στην έναρξη δηλαδή του φαινομένου της εκχύλισης είναι σχεδόν αμελητέα, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Με την εξέλιξη της εκχύλισης εμφανίζονται οι επιμέρους διαφορές της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όπως συνέβη και στις χλωροφύλλες. Σχετικά με τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 60°C με χρήση αιθανόλης 75%, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για την συνθήκη PEF300, ενώ για τις συνθήκες PEF600 και PEF1000 παρατηρείται σημαντική μείωση του TEAC_o, σε σχέση με τους 45°C. Όπως έχει προαναφερθεί, σύμφωνα με τον Hartmut K. Lichtenthaler (1987) η έκθεση των αντιοξειδωτικών σε υψηλές θερμοκρασίες και η παραμονή τους σε διαλύτες οι οποίοι περιέχουν ποσοστό νερού μεγαλύτερο από 10%, ευνοούν την αυτοοξείδωσή τους, η οποία οδηγεί σε μειωμένες τιμές TEAC_o.

Διαβάζοντας τον **Πίνακα 5.10** καθέτως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης, συμπεραίνεται πως και η περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, εφόσον ούτε σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των TEAC_o. Για τις θερμοκρασίες εκχύλισης 30 και 45°C η αύξηση της αιθανόλης του διαλύτη από 75 σε 95% v/v επιφέρει αύξηση της αρχικής αντιοξειδωτικής ικανότητας έως και 57.6 %, ενώ στους 60°C η αύξηση του TEAC_o αγγίζει το 15 % στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με τη συνθήκη PEF1000. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται από την αύξηση του περιεχόμενου νερού στην χαμηλή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης, όπως περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο.

Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω σχολιασμός με ανάγνωση του **Πίνακα 5.10** διαγωνίως. Έτσι παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί ελάττωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη, ώστε να επιτευχθούν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές της αρχικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, και αντιστρόφως. Για παράδειγμα στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων με PEF300 οι τιμές C_0 για εκχύλιση στους 45°C και σε αιθανόλη 85 και 75% δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για εκχύλιση στους 30°C και σε αιθανόλη 95 και 85%.

Τέλος, εξετάζοντας την επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, παρατηρείται πως αυτή είναι λιγότερο σημαντική. Αυτό τεκμηριώνεται και από τις μειωμένες αυξήσεις του C_0 στα επεξεργασμένα κύτταρα, σε σχέση με τα μη διαρρηγμένα. Πρόκειται για αρχικές συγκεντρώσεις και χρόνο μηδέν, οπότε το φαινόμενο της εκχύλισης δεν έχει προλάβει να εξελιχθεί, ώστε να φανούν οι επιδράσεις της προκατεργασίας, τόσο έντονα όσο παρατηρήθηκε στην τελική αντιοξειδωτική ικανότητα στα ανακτημένα εκχυλίσματα μετά το πέρας των 6 ωρών.

5.5.4 Χαρακτηριστικός χρόνος εξέλιξης της απελευθέρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών των εκχυλισμάτων (τ_{TEAC})

Πίνακας 5.11 Χαρακτηριστικός χρόνος εξέλιξης της απελευθέρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών, από κάθε προσαρμογή στα πειραματικά σημεία για κάθε συνθήκη εκχύλισης.

CONTROL			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.35 ± 0.7 ^{abcd}	0.95 ± 0.4 ^{abcd}	0.93 ± 0.4 ^{abcd}
85 % Αιθανόλη	1.07 ± 0.6 ^{abcde}	1.64 ± 1.0 ^{de}	0.73 ± 0.7 ^{abcd}
75 % Αιθανόλη	1.05 ± 0.3 ^{abcd}	1.01 ± 0.8 ^{abcd}	0.49 ± 1.5 ^{abcd}
PEF 300			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.68 ± 0.7 ^{de}	0.99 ± 0.4 ^{abcd}	0.85 ± 0.3 ^{abcd}
85 % Αιθανόλη	1.32 ± 0.6 ^{cde}	0.74 ± 0.4 ^{abcd}	0.57 ± 0.3 ^{abcd}
75 % Αιθανόλη	1.47 ± 0.5 ^{cde}	1.1 ± 0.5 ^{abcde}	0.55 ± 0.3 ^{abcd}
PEF 600			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.66 ± 1.3 ^{de}	1.46 ± 0.5 ^{cde}	0.68 ± 0.6 ^{abcd}
85 % Αιθανόλη	1.57 ± 1.1 ^{cde}	0.61 ± 0.4 ^{abcd}	1.16 ± 0.5 ^{abcde}
75 % Αιθανόλη	2.30 ± 0.7 ^e	1.13 ± 0.6 ^{abcde}	0.34 ± 0.1 ^{abc}
PEF 1000			
	30°C	45°C	60°C
95 % Αιθανόλη	1.41 ± 0.8 ^{cde}	1.02 ± 0.4 ^{abcd}	0.73 ± 0.2 ^{abcd}
85 % Αιθανόλη	1.43 ± 0.7 ^{cde}	0.89 ± 0.3 ^{abcd}	0.04 ± 0.01 ^{ab}
75 % Αιθανόλη	0.83 ± 0.4 ^{abcd}	1.27 ± 0.4 ^{bcde}	0.01 ± 0.02 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± η τυπική απόκλιση

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 5.11**, παρατηρείται ότι με όποιο τρόπο και αν διαβαστεί, οριζοντίως, καθέτως ή διαγωνίως, για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για σταθερή περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη, εξαιρώντας τους 60°C για 75% αιθανόλη, διαπιστώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του χαρακτηριστικού χρόνου εκχύλισης. Συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 30 σε 45°C με χρήση αιθανόλης 95% μειώνει την παράμετρο αυτού του χρόνου κατά 42 % στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων ενώ αν συγκριθεί η θερμοκρασία των 45 °C με των 60 °C παρατηρείται ότι παραμένει σταθερός ο χρόνος. Στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων PEF1000, η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30 στους 60°C προκαλεί μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου κατά 34 %. Σχετικά με τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 60°C με χρήση αιθανόλης 75%, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για την συνθήκη PEF300, ενώ για τις συνθήκες PEF600 και PEF1000 παρατηρείται σημαντική μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου, σε σχέση με τους 45 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης στους 60 °C σε 75% αιθανόλη πιθανότατα αυξάνει την εκχυλισιμότητα των αντιοξειδωτικών όπως και στις υπόλοιπες περιπτώσεις, αλλά παράλληλα οδηγεί σε απότομη σταθεροποίηση του φαινομένου της εκχύλισης σε ήδη πολύ μικρότερο χρόνο. Έτσι, φτάνουμε στον χαρακτηριστικό χρόνο της εκχύλισης, στον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3% του φαινομένου πολύ γρηγορότερα στην υψηλή θερμοκρασία, με ίδιο τρόπο, όπως και στην περίπτωση των χλωροφυλλών.

5.5.5 Επίδραση της επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο χρόνο t_{95} , ο οποίος αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 1.12 Χρόνος t_{95} της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων για κάθε επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, θερμοκρασία εκχύλισης και περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη.

T = 30 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	3.20 ± 1.52 ^a	2.56 ± 1.27 ^b	2.57 ± 0.66 ^b
PEF 300	3.95 ± 1.41 ^a	1.42 ± 0.52 ^{ab}	1.13 ± 0.22 ^a
PEF 600	3.31 ± 2.45 ^a	0.97 ± 0.46 ^a	1.27 ± 0.25 ^a
PEF 1000	3.16 ± 1.63 ^a	1.29 ± 0.45 ^{ab}	0.62 ± 0.17 ^a
T = 45 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	2.24 ± 0.86 ^b	3.90 ± 2.21 ^b	2.22 ± 1.62 ^a
PEF 300	1.09 ± 0.32 ^a	1.09 ± 0.58 ^a	0.95 ± 0.33 ^a
PEF 600	1.16 ± 0.32 ^a	0.88 ± 0.53 ^a	0.72 ± 0.25 ^a
PEF 1000	0.70 ± 0.16 ^a	1.07 ± 0.36 ^a	1.26 ± 0.38 ^a
T = 60 °C			
ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	95 % EtOH	85 % EtOH	75 % EtOH
CONTROL	2.15 ± 0.77 ^b	1.42 ± 1.23 ^b	0.26 ± 2.82 ^a
PEF 300	0.94 ± 0.28 ^a	0.77 ± 0.37 ^b	0.67 ± 0.33 ^a
PEF 600	0.43 ± 0.29 ^a	1.37 ± 0.56 ^b	0.44 ± 0.21 ^a
PEF 1000	0.39 ± 0.08 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών των χρόνων t_{95} , για ίδιες συνθήκες εκχύλισης (σταθερή θερμοκρασία και περιεκτικότητα αιθανόλης του διαλύτη), όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

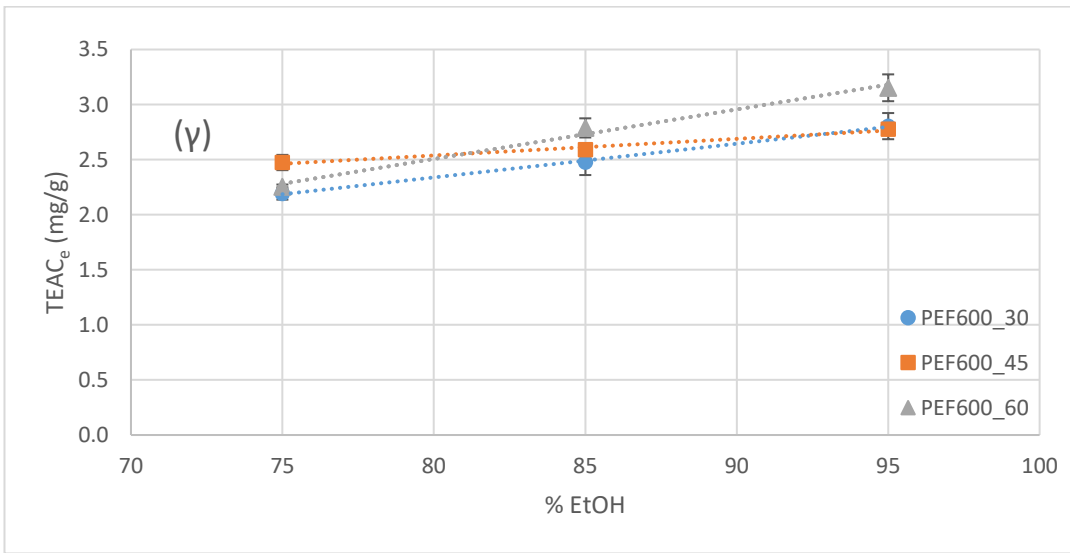
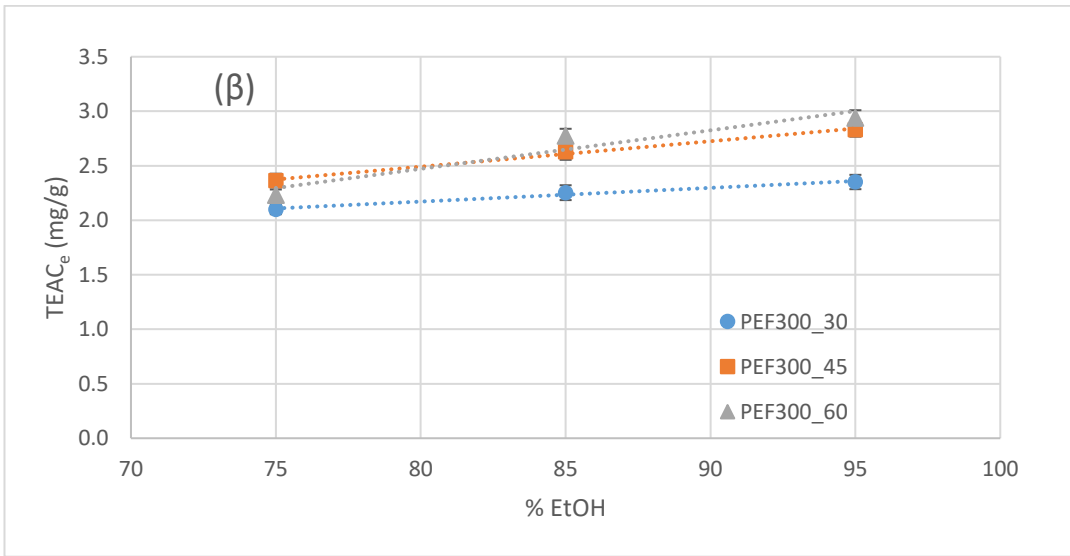
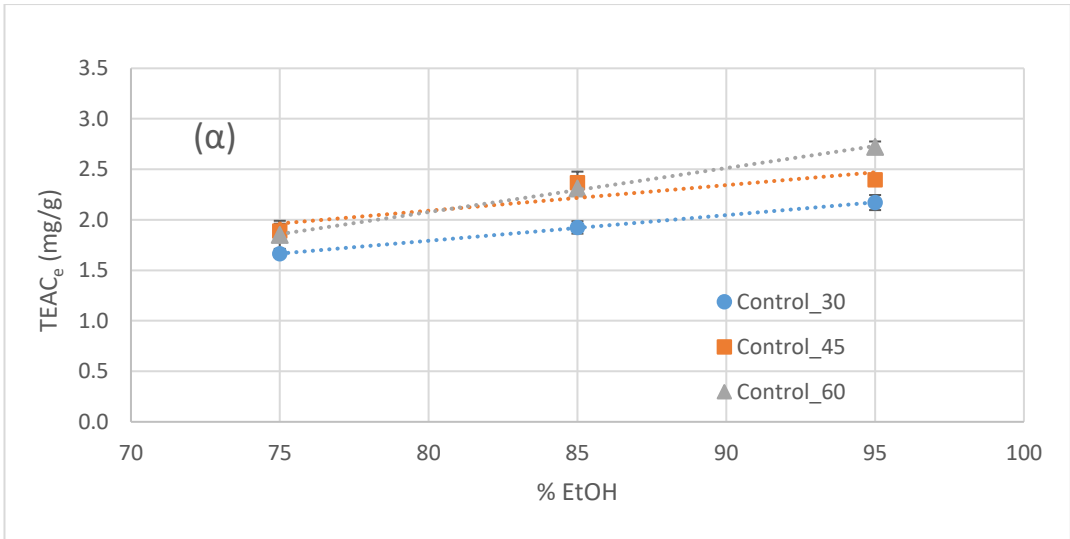
± η τυπική απόκλιση

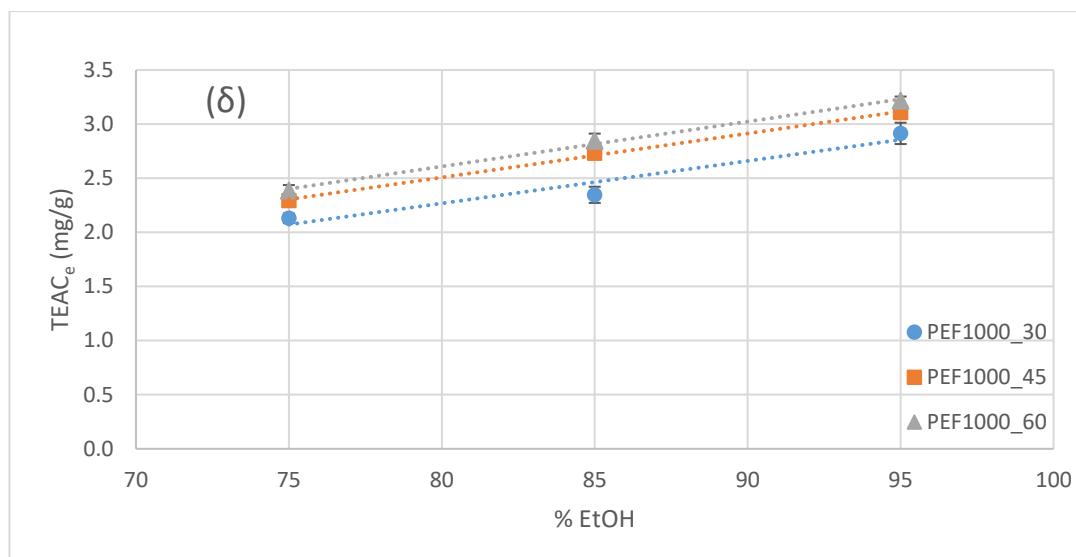
Ο **Πίνακας 5.12**, διαβάζεται και πάλι καθέτως, για τη μελέτη της επίδρασης μόνο των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στον χρόνο t_{95} . Σε θερμοκρασία 30°C, και σε περιεκτικότητα 95 % v/v του διαλύτη σε αιθανόλη, παρατηρείται ότι οι διαφορές του χρόνου δεν είναι σημαντικές. Αντίθετα, σε θερμοκρασία 45°C και 60°C, οι τιμές του χρόνου μειώνονται σημαντικά. Ειδικότερα, τώρα στη συνθήκη PEF 600 στους 45°C και για σταθερή περιεκτικότητα σε αιθανόλη 85 % v/v, παρατηρείται ότι ο χρόνος έχει μειωθεί κατά σχεδόν 77 % σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα δείγματα CONTROL. Ο χρόνος μειώνεται από την τιμή (3.90 ± 2.21) h στην τιμή (0.88 ± 0.53) h. Το προφίλ της μείωσης του χρόνου τ_{95} , ακολουθεί την ίδια πορεία σε όλες τις συνθήκες εκτός από τη συνθήκη των 30°C, περιεκτικότητας 95 % σε αιθανόλη, όπου η παράμετρος αυτή του χρόνου δε διαφέρει σημαντικά. Οι διαφορές μεταξύ των χρόνων t_{95} , δεν είναι τόσο σημαντικές όσο οι αντίστοιχες διαφορές που εμφανίζει η παράμετρος αυτή στην εκχύλιση των χλωροφυλλών. Όπως παρατηρείται και από τα διαγράμματα του ποσοστού ανακτημένης λουτεΐνης, αλλά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανακτημένων εκχυλισμάτων συναρτήσει του χρόνου, οι αποδόσεις σταθεροποιούνται και το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί ήδη στις 3 h. Τα αποτελέσματα του **Πίνακα 5.12** δείχνουν ότι οι χρόνοι είναι μικρότεροι της 1h. Επομένως, έτσι εξηγείται το ότι δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου t_{95} .

5.5.6 Επίδραση της περιεκτικότητας σε EtOH του διαλύτη της εκχύλισης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

Η επίδραση της περιεκτικότητας της αιθανόλης που χρησιμοποιείται για τον διαλύτη της εκχύλισης, επιδρά σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα αυτή, τόσο μεγιστοποιείται και η τελική ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα $TEAC_e$.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα, στα οποία έγινε γραμμική προσαρμογή του μοντέλου σε όλες τις συνθήκες προεπεξεργασίας των κυττάρων.





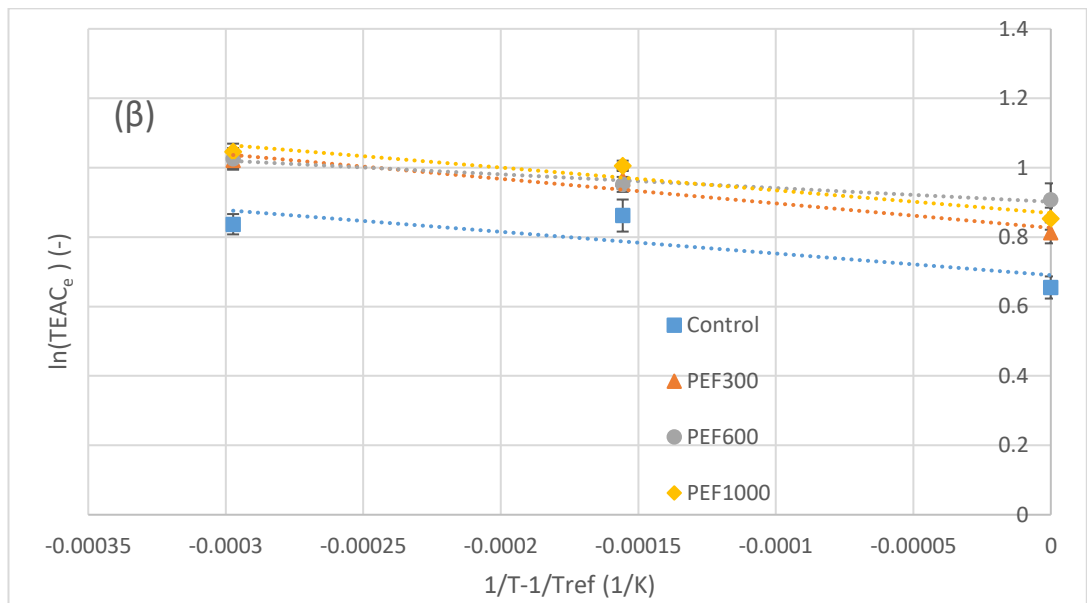
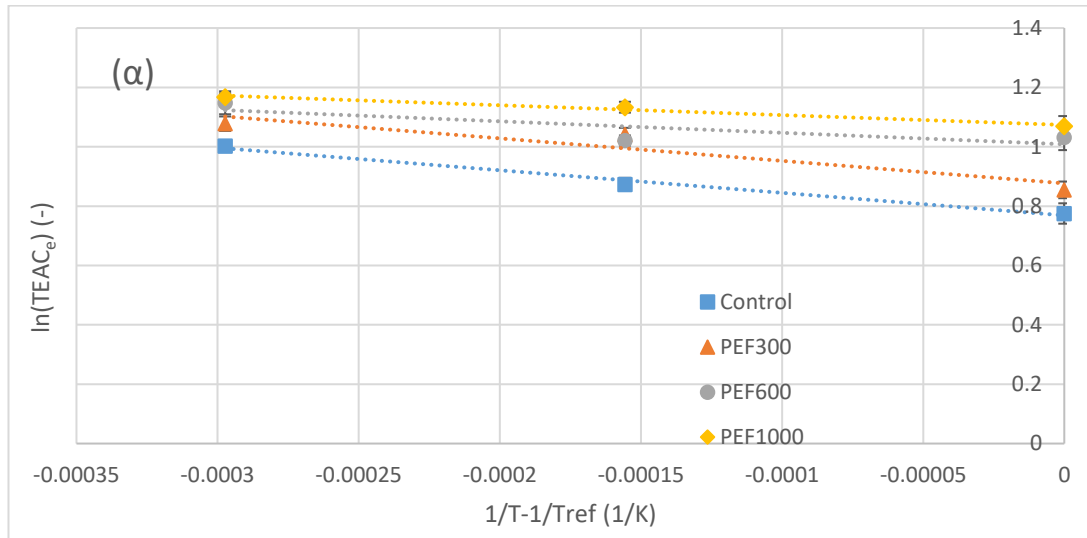
Διάγραμμα 5.12 Τελική αντιοξειδωτική ικανότητα $TEAC_e$ (mg trolox / g ξηρής βιομάζας) συναρτήσει του ποσοστού αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης για ανεπεξέργαστα (α) και επεξεργασμένα κύτταρα με τις συνθήκες PEF300 (β), PEF600 (γ) και PEF1000 (δ) σε όλες τις θερμοκρασίες εκχύλισης. Οι γραμμές απεικονίζουν απλή γραμμική προσαρμογή στα πειραματικά σημεία.

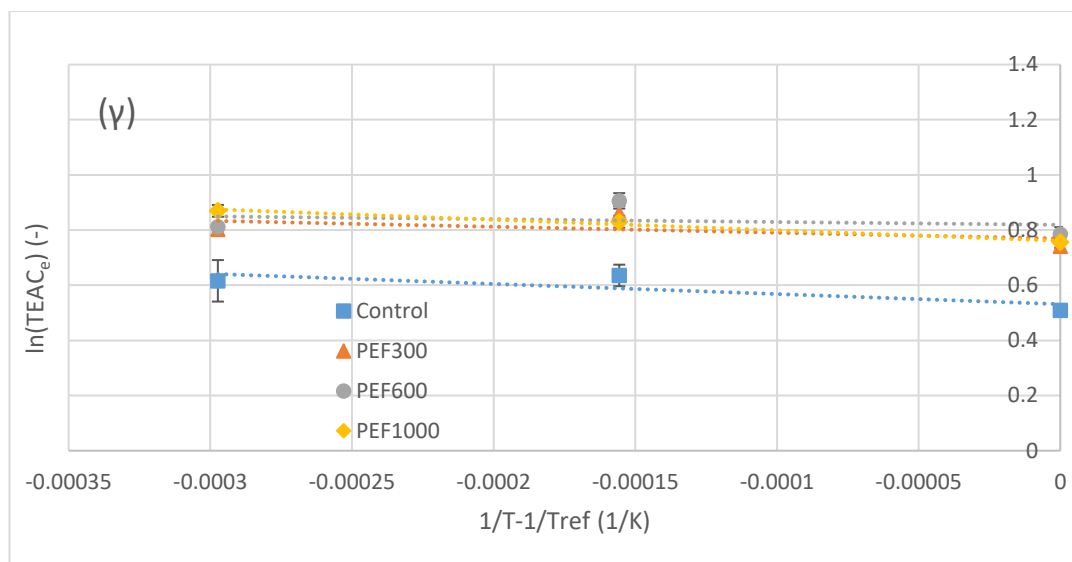
Όπως φαίνεται σε όλες τις περιπτώσεις οι ευθείες είναι σχεδόν παράλληλες, γεγονός που υποδεικνύει την ίδια εξάρτηση όλων των επιμέρους συνθηκών από την περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται στην συνθήκη PEF1000, με την αντίστοιχη της PEF600 να την ανταγωνίζεται και να την πλησιάζει.

5.5.7 Επίδραση της θερμοκρασίας της εκχύλισης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί η κινητική της εκχύλισης όσον αφορά στην ολική ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού έγινε χρήση του μοντέλου της **Εξίσωσης**, δηλαδή, **4.6**, για κάθε επεξεργασία και θερμοκρασία επώασης, εφαρμόστηκε η εξίσωση του Arrhenius στην παράμετρο $TEAC_e$, στη συνολική, δηλαδή, αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία επιτυγχάνεται στο τέλος της εκχύλισης, και κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα αυτής της ποσότητας εκφρασμένης σε mg trolox / g ξηρής βιομάζας, συναρτήσει του όρου $\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}$, για κάθε περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, καθώς και οι δείκτες R^2 κάθε προσαρμογής.





Διάγραμμα 5.13 Διαγράμματα Arrhenius για την τελική αντιοξειδωτική ικανότητα TEAC_e για κάθε επεξεργασία και περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη (α) 95%, (β) 85% και (γ) 75%

Πίνακας 5.13 Παράμετρος R² για κάθε προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius

R ²				
% Αιθανόλη	Control	PEF 300	PEF 600	PEF 1000
95	0.9891	0.8879	0.8598	0.9799
85	0.8745	0.9428	0.9719	0.9163
75	0.7428	0.7884	0.7575	0.7991

Παρατηρώντας το **Διάγραμμα 5.13**, παρατηρείται ότι οι ευθείες που προκύπτουν από την προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius είναι μεταξύ τους παράλληλες στο θερμοκρασιακό εύρος, που μελετάται, εκτός από εκείνες που αντιστοιχούν σε διαλύτη με περιεκτικότητα αιθανόλης 75%. Εστιάζοντας στο **Διάγραμμα 5.13 (α)** παρατηρείται μια ανοδική μετατόπιση των ευθειών συναρτήσει της ενέργειας επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, υποδεικνύοντας την αυξημένη απόδοση της εκχύλισης των αντιοξειδωτικών με την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η εξάρτηση του φαινομένου από την θερμοκρασία εκχύλισης. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο **Διάγραμμα**

5.13(β). Μεταξύ των διάφορων συνθηκών PEF, παρατηρείται πως η συνθήκη PEF600 ταυτίζεται με την PEF1000, γεγονός που υποδεικνύει πως η PEF600 προτιμάται έναντι των άλλων δύο, γιατί επιφέρει σημαντικές διαφορές σε σχέση με την PEF300 και επιτυγχάνει πρακτικά το ίδιο αποτέλεσμα με την PEF1000, όσον αφορά την απόδοση της ανάκτησης των αντιοξειδωτικών. Εστιάζοντας στο **Διάγραμμα 5.13 (γ)** παρατηρείται σημαντική αύξηση των τιμών $\ln(\text{TEAC}_e)$ στους 30°C έως και κατά 0.5 λογαρίθμους μεταξύ των επεξεργασμένων και του ανεπεξέργαστου δείγματος. Παρατηρώντας και τα τρία διαγράμματα μαζί, η επίδραση της επεξεργασίας των κυττάρων με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι εμφανέστατη και όσον αφορά την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη. Για την θερμοκρασία εκχύλισης των 30°C η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορεί να μειώσει το ποσοστό αιθανόλης του διαλύτη κατά 10% σε κάθε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα σε αυτήν την θερμοκρασία, οι τιμές $\ln(\text{TEAC}_e)$ των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με παλμικά ηλεκτρικά πεδία και επωάστηκαν σε αιθανόλη 75% δεν διαφέρουν σημαντικά από την αντίστοιχη τιμή των ανεπεξέργαστων κυττάρων που επωάστηκαν σε αιθανόλη 85%. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τις περιεκτικότητες 85 και 95% στους 30°C, και για όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες μεταξύ των περιεκτικότητων 85 και 95%.

Εν κατακλείδι, η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία αυξάνει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης, καθώς μπορεί να μειώσει το ποσοστό αιθανόλης έως και 20% σε θερμοκρασία 60°C, ώστε να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα σε σχέση με το ανεπεξέργαστο υλικό στην ίδια θερμοκρασία. Τέλος, η επεξεργασία PEF600 επιλέγεται ως βέλτιστη συνθήκη παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, γιατί επιφέρει το βέλτιστο αποτέλεσμα με την μικρότερη παροχή ενέργειας.

Από τις κλίσεις των διαγραμμάτων υπολογίζεται και πάλι η ενέργεια ενεργοποίησης, η οποία μας δείχνει την εξάρτηση του φαινομένου της εκχύλισης από τη θερμοκρασία. Οι τιμές τους παρατίθενται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 5.14**.

Πίνακας 5.14 Ενέργεια ενεργοποίησης για κάθε κυτταρικό υλικό και διαλύτη της εκχύλισης.

Ea (kJ/mol)				
% Αιθανόλη	C	PEF 300	PEF 600	PEF 1000
95	6.32 ± 0.2 ^a	6.29 ± 0.4 ^a	6.21 ± 0.2 ^{abc}	6.76 ± 0.6 ^{abc}
85	5.19 ± 0.6 ^{ab}	5.87 ± 0.4 ^{ab}	5.28 ± 0.2 ^{abc}	5.45 ± 0.3 ^{ab}
75	5.05 ± 0.8 ^{abc}	5.78 ± 0.5 ^{bc}	5.85 ± 0.5 ^c	5.18 ± 0.6 ^{abc}

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψαν από το Duncan's test.

± τυπική απόκλιση

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 5.14**, μπορούμε να εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι η ενέργεια ενεργοποίησης δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεξεργασιών των κυττάρων σε δείγματα ίδιας περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης.

Όλες οι τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης είναι μικρότερες από $10 \frac{kJ}{mol}$. Επομένως, η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, από τη θερμοκρασία δεν είναι σημαντική.

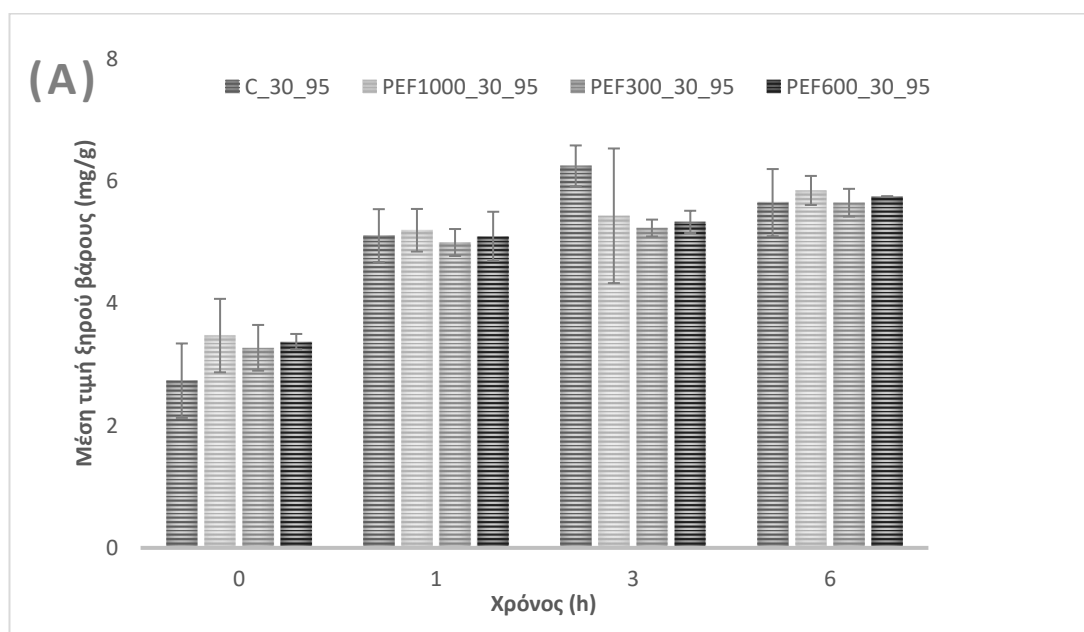
5.5.8 Ανακεφαλαίωση

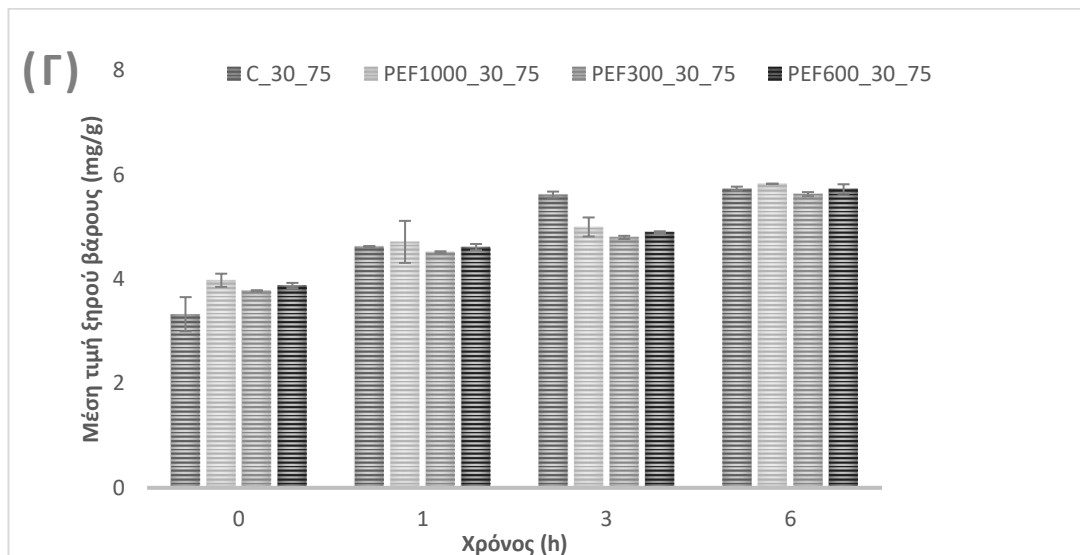
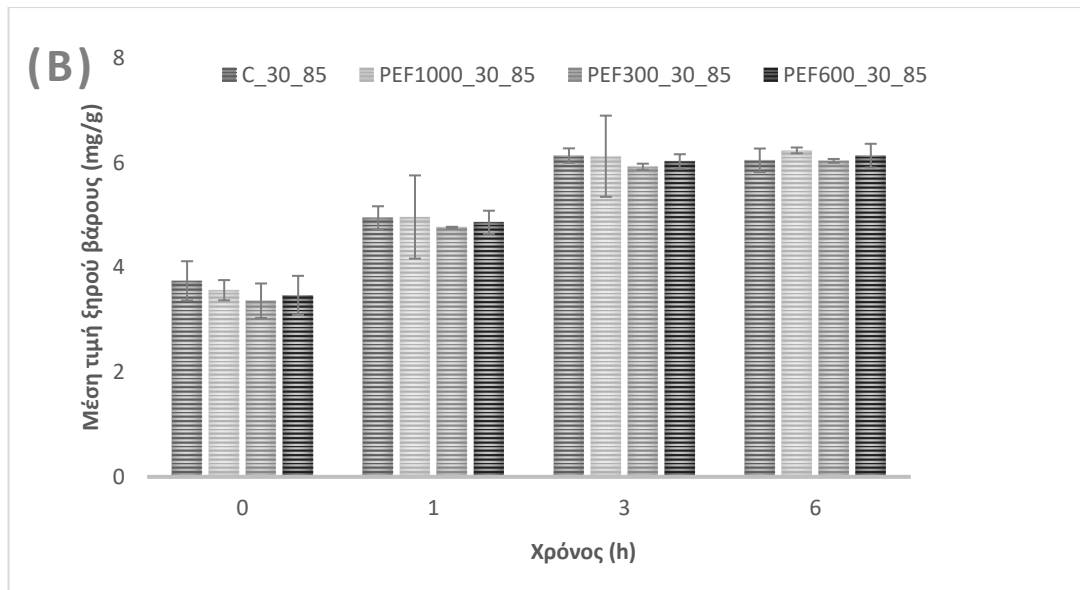
Η εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων ευνοεί σημαντικά την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα η συνθήκη PEF1000, αυξάνει την ικανότητα αυτή έως και κατά 18 %, καθιστώντας τη ίση με $3.22 \pm 0.04 \frac{mg \text{ trolox}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ (60°C, 95 % αιθανόλη). Όπως και στην μελέτη της κινητικής της ανάκτησης των χλωροφυλλών, η συνθήκη της εκχύλισης στους 60°C και η χρήση αιθανόλης 95 % επιτυγχάνει τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα ανεπεξέργαστα δείγματα, ίση με $2.72 \pm 0.05 \frac{mg \text{ trolox}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$. Ωστόσο, πρακτικά ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα δίνει η εφαρμογή των 300 παλμών είτε με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 60°C και μείωση της

περιεκτικότητας σε 85 % v/v, είτε με διατήρηση της περιεκτικότητας σε 95 % v/v και μείωση της θερμοκρασίας στους 45 °C.

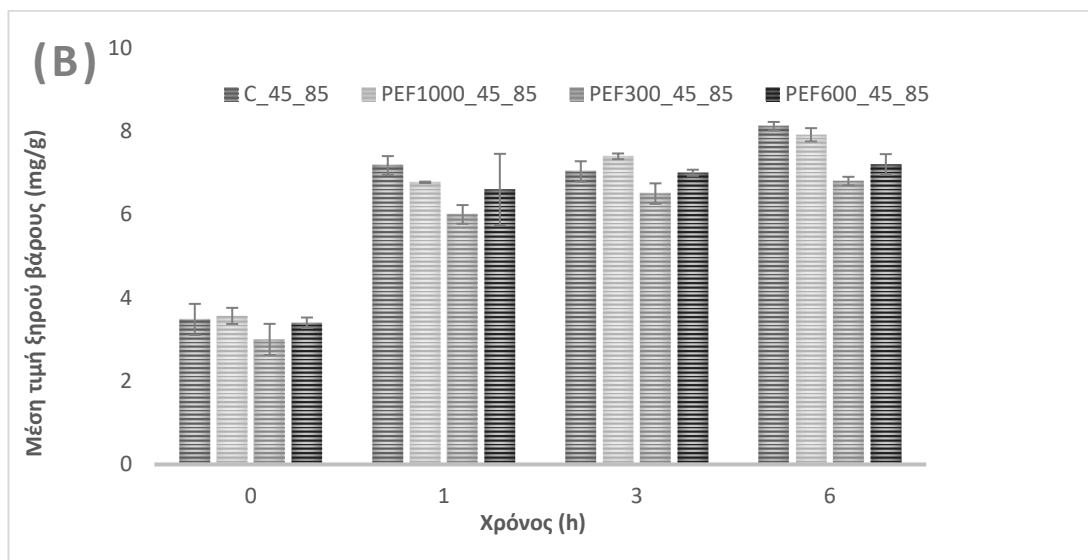
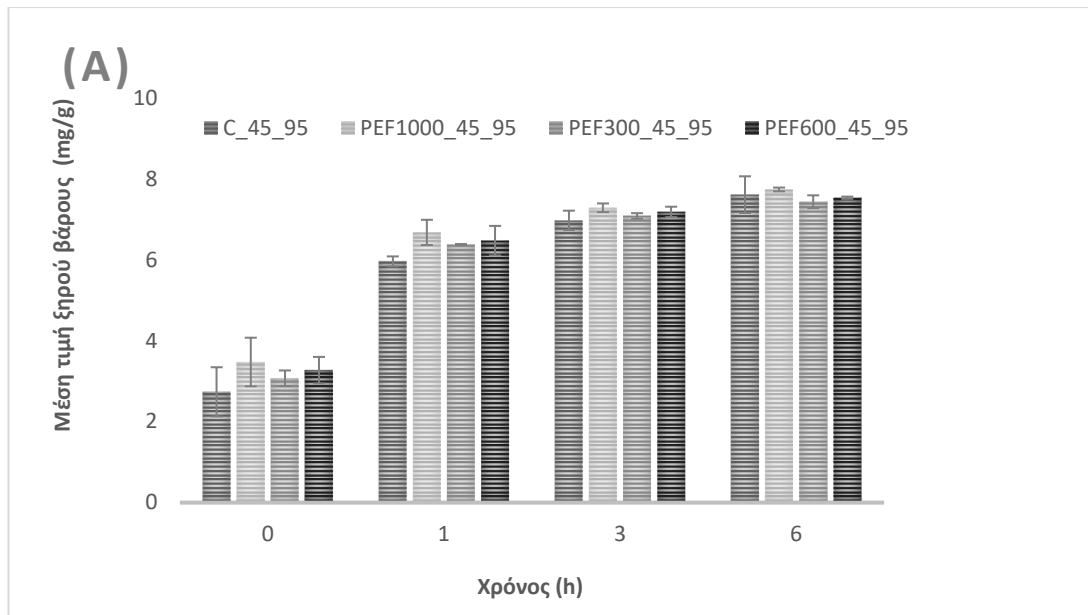
5.6 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων.

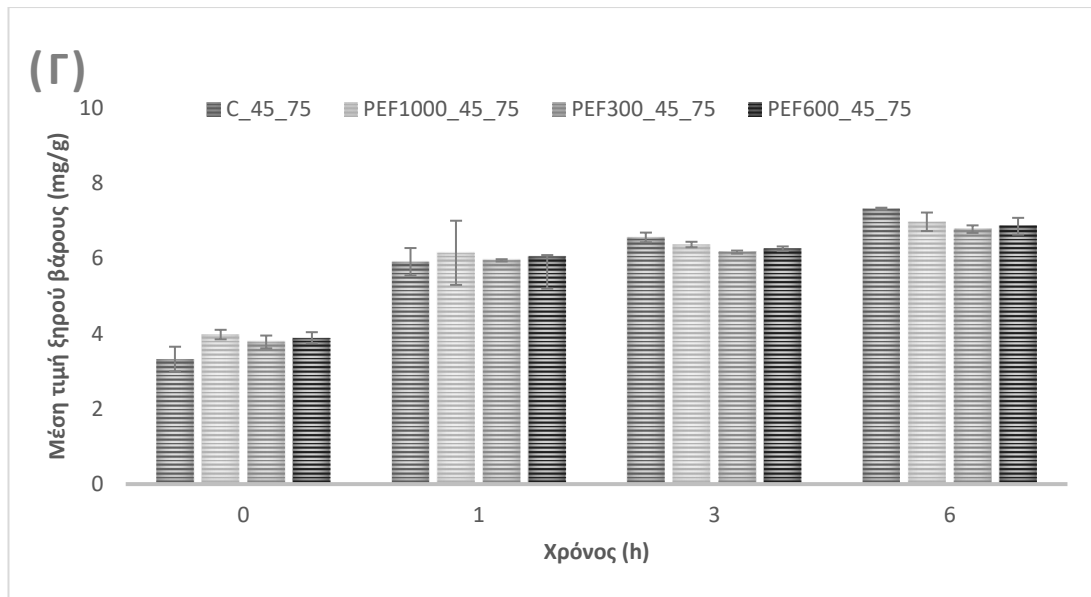
Για να σχολιαστεί η επίδραση των διάφορων παραμέτρων στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα για κάθε θερμοκρασία εκχύλισης, κάθε συνθήκη επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία και κάθε περιεκτικότητα του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη.





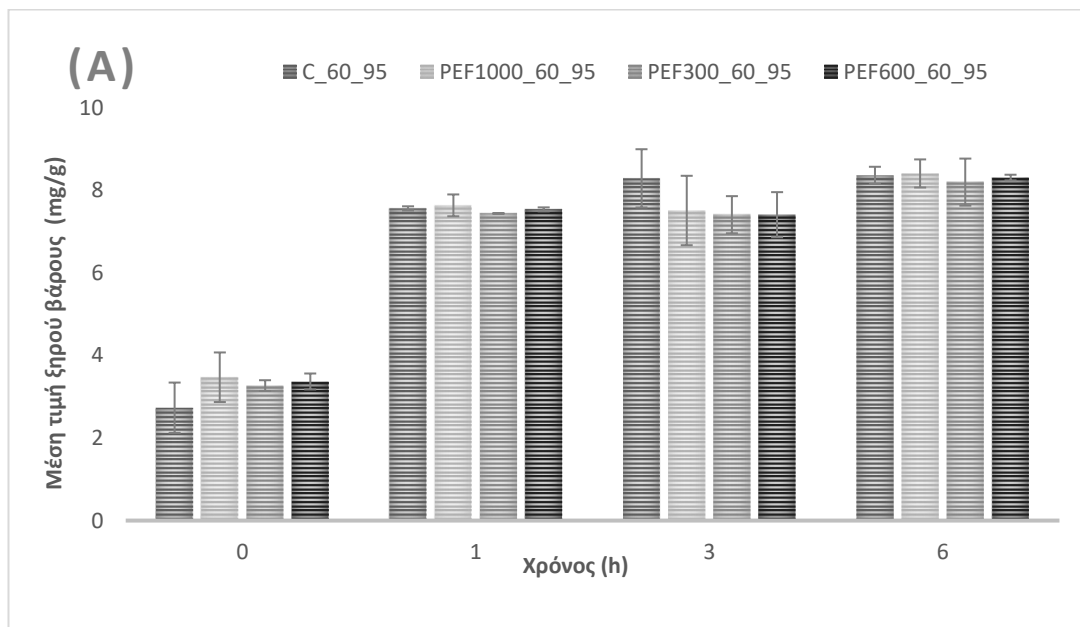
Διάγραμμα 5.14 Μέσο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος για κάθε πειραματική συνθήκη προεπεξεργασίας, στους 30 °C σε περιεκτικότητες σε αιθανόλη (Α) 95 % v/v, (Β) 85 % v/v, (Γ) 75 % v/v.

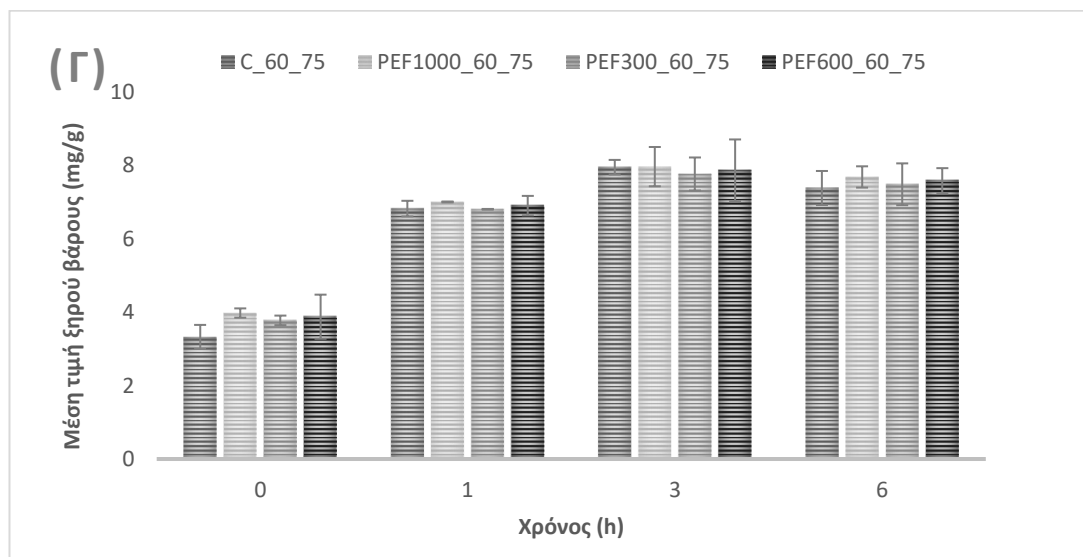
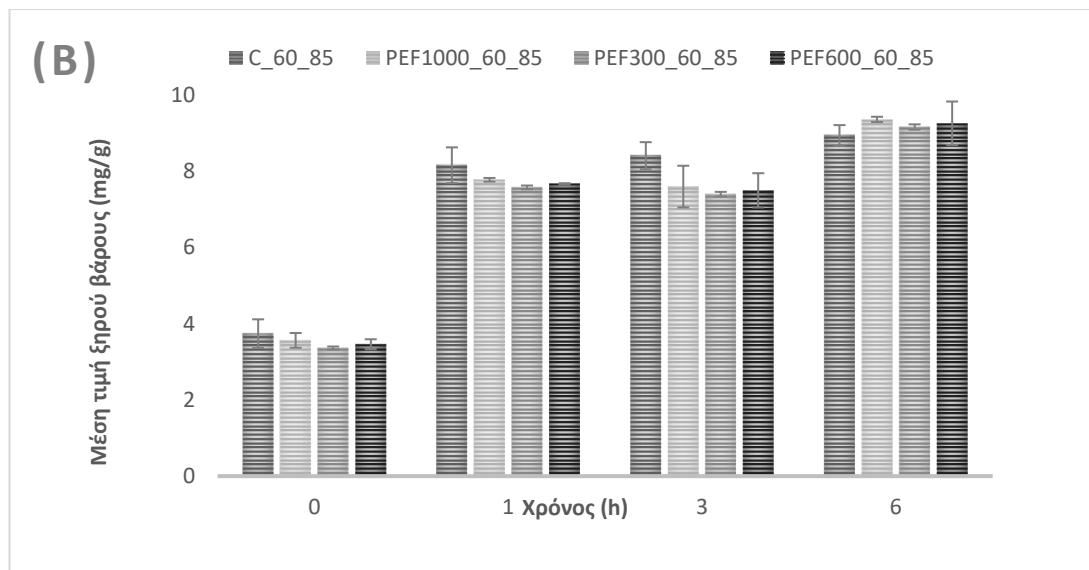




Διάγραμμα 5.15 Μέσο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος για κάθε πειραματική συνθήκη προεπεξεργασίας, στους 45 °C σε περιεκτικότητες σε αιθανόλη (Α) 95 % v/v, (Β) 85 % v/v, (Γ) 75 % v/v.

Αυξανόμενης της θερμοκρασίας αυξάνεται σταδιακά το ποσοστό του βάρους της ξηρής βιομάζας.





Διάγραμμα 5.16 Μέσο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος για κάθε πειραματική συνθήκη προεπεξεργασίας, στους 60 °C σε περιεκτικότητες σε αιθανόλη (A) 95 % v/v, (B) 85 % v/v, (Γ) 75 % v/v.

Παρατηρείται ότι στο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος η προεπεξεργασία των κυττάρων του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, καθώς και η περιεκτικότητα της αιθανόλης στο διαλύτη της εκχύλισης δεν επιδρά στα τελικά αποτελέσματα. Αυτό δεν είναι παράδοξο, γιατί εκτός από τις χρωστικές ουσίες, χλωροφύλλες και καροτενοειδή, το εκχύλισμα περιέχει και άλλα βιοδραστικά συστατικά, τα οποία ενδεχομένως περνούν στο υπερκείμενο υγρό που οδηγείται προς ξήρανση δίνοντας ξηρό βάρος το οποίο είναι ίδιο σε όλες τις συνθήκες. Έτσι, η μόνη παράμετρος που επιδρά στην αύξηση ή μείωση του βάρους του ξηρού υπολείμματος της εκχυλισμένης βιομάζας είναι αντίστοιχα η αύξηση ή η μείωση της θερμοκρασίας. Με τη

θερμοκρασία, άλλωστε, ευνοείται ή όχι η εκχυλισιμότητα των χρωστικών ουσιών δίνοντας έτσι μεγαλύτερα ή μειωμένα, κάθε φορά, ποσοστά ανάκτησης. Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα, μελετώντας τη συνθήκη που προτιμάται, δηλαδή για χρονική στιγμή $t = 3h$, σε περιεκτικότητα 85 % στο PEF600, παρατηρείται σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα στους 30°C, βρέθηκε το ξηρό βάρος του εκχύλισματος ίσο με 6.12 mg ξηρής βιομάζας/ g κυτταρικής ύλης, στους 45°C 6.37 mg/g και στους 60°C 7.51 mg ξηρής βιομάζας ανά g κυτταρικής ύλης.

Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και στην τελευταία θερμοκρασία, στην οποία το ξηρό υπόλειμμα έχει αυξηθεί κατά πολύ, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η μόνη παράμετρος που επιδρά στην αύξηση ή μείωση του βάρους του ξηρού υπολείμματος της εκχυλισμένης βιομάζας είναι αντίστοιχα η αύξηση ή η μείωση της θερμοκρασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συμπεράσματα

6.1 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών

Συμπερασματικά, όπως προέκυψε και από τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, το τελικό ποσοστό ανακτημένων χλωροφυλλών εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), η οποία επέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών ανάκτησης μεταξύ των θερμοκρασιών επώασης 30, 45 και 60°C, αλλά και από τις τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης (>10 kJ/mol) που προέκυψαν από της εξίσωση Arrhenius.

Όπως διαπιστώθηκε και από τον **Πίνακα 5.1**, του προηγούμενου **Κεφαλαίου 5**, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 30 σε 60 °C με χρήση διαλύτη περιεκτικότητας 95% σε αιθανόλη, αύξησε το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης χλωροφυλλών κατά 32% στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων κυττάρων και κατά 34% στην περίπτωση των επεξεργασμένων κυττάρων PEF1000.

Ωστόσο, διαπιστώθηκε πως η θερμοκρασία εκχύλισης 60°C σε συνδυασμό με διάλυμα αιθανόλης σε νερό, περιεκτικότητας 75 % σε αιθανόλη, προκαλεί σημαντική μείωση του ποσοστού C_e , λόγω της υποβάθμισης των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες, γεγονός που καθιστά τον συγκεκριμένο συνδυασμό πρακτικά ακατάλληλο για την ανάκτηση των χλωροφυλλών.

Όσον αφορά στην προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, αυτή οδηγεί επίσης σε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των συνθήκης PEF600 και PEF1000 αν συγκριθούν με τα ανεπεξέργαστα δείγματα CONTROL. Τα ποσοστά ανάκτησης μεγιστοποιούνται αναλογικά με τους παλμούς που εφαρμόζονται. Ειδικά, σε θερμοκρασία 60°C και περιεκτικότητα 95% το ποσοστό ανάκτησης είναι στο δείγμα CONTROL $82.5\% \pm 2.1\%$, ενώ έπειτα από επεξεργασία με τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία 1000 παλμών προκύπτει ανακτώμενο ποσοστό στην ίδια θερμοκρασία και περιεκτικότητα, $99.4\% \pm 2.6\%$, πρακτικά ίσο με 100%. Αντίστοιχου μεγέθους αύξηση παρατηρείται και στις άλλες δύο θερμοκρασίες των 30°C και 45°C, όπου επιτυγχάνεται στη συνθήκη PEF1000 στους 45°C $70.0\% \pm 1.6\%$

έναντι $58.2\% \pm 1.2\%$ των ανεπεξέργαστων κυττάρων σε περιεκτικότητα αιθανόλης 85% v/v.

Σχετικά με τις συνθήκες επεξεργασίας PEF600 και PEF1000 δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τελικών ποσοστών ανάκτησης χλωροφυλλών C_e . Για παράδειγμα η χρήση διαλύτη με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 85%, στους 45°C, επιφέρει απόδοση ανάκτησης χλωροφυλλών $70.0\% \pm 1.6\%$ στη συνθήκη PEF1000 και $68.8\% \pm 1.2\%$ στη συνθήκη PEF600.

Είναι φανερό, όπως παρουσιάζεται και παραπάνω, η επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης στα τελικά ποσοστά ανακτημένων χλωροφυλλών. Σε κάθε συνθήκη, τα μέγιστα ποσοστά ανάκτησης εμφανίζονται στην περιεκτικότητα αιθανόλης 95% v/v. Ωστόσο η εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων μπορεί να προκαλέσει μείωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη σε συνδυασμό με ικανοποιητικές αποδόσεις ανάκτησης χλωροφυλλών.

6.2 Επίδραση των συνθηκών πραγματοποίησης της εκχύλισης στην ανακτημένη λουτεΐνη

Τόσο η θερμοκρασία, όσο και η σύσταση του διαλύτη της εκχύλισης σε αιθανόλη, επιδρούν σημαντικά στα τελικά ποσοστά ανακτημένης λουτεΐνης των εκχυλισμάτων. Σε θερμοκρασία 60°C και περιεκτικότητα 95 % προέκυψαν τα μέγιστα ποσοστά.

Επίσης, η επεξεργασία των αιωρημάτων μικροφυκών *Chlorella pyrenoidosa* με παλμικά ηλεκτρικά πεδία προκαλεί σημαντικές αυξήσεις στο ποσοστό της ανακτημένης λουτεΐνης. Συγκεκριμένα, ήδη για χρόνο $t=3h$, η συνθήκη PEF600 αύξησε το ποσοστό ανακτημένης λουτεΐνης κατά 10 % σε όλες τις συνθήκες θερμοκρασίας και περιεκτικότητας. Παρ' όλα αυτά η αύξηση της ειδικής ενέργειας επεξεργασίας μεταξύ των συνθηκών που επιλέχθηκαν δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων από τα επεξεργασμένα κύτταρα.

6.3 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην τελική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

Όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω, η αύξηση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη του διαλύτη της εκχύλισης, καθώς και οι μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης αυξάνουν εκτός των άλλων και την τελική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, που παραλαμβάνονται. Η θερμοκρασία, από την άλλη, δεν επιδρά σημαντικά όπως φαίνεται και από τις ενέργειες ενεργοποίησης, οι οποίες είναι μικρότερες από $10 \frac{kJ}{mol}$. Συγκεκριμένα, συγκρίνονται τα αποτελέσματα της επιλεχθείσας συνθήκης, δηλαδή η πραγματοποίηση της εκχύλισης στους 45°C, η χρήση διαλύτη 85 % σε αιθανόλη v/v και η προεπεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία 600 παλμών ανά κύκλο διάρρηξης. Παρατηρείται ότι τα ανεπεξέργαστα δείγματα δίνουν εκχυλίσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας ίσης με 2.37 ± 0.11 mg trolox/g ξηρής βιομάζας, ενώ τα διερρηγμένα σε 600 παλμούς κύτταρα δίνουν ικανότητα της τάξης των 2.59 ± 0.06 mg trolox/g ξηρής βιομάζας. Συμπεραίνεται, έτσι, ότι οι επεξεργασίες με παλμικά ηλεκτρικά πεδία αυξάνουν τα ποσοστά ανάκτησης, συγκριτικά με τα ανεπεξέργαστα δείγματα, ωστόσο μεταξύ τους δε διαφέρουν ιδιαίτερα.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων οφείλεται κατά κύριο λόγο στη λουτεΐνη, το βασικό καροτενοειδές του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, δεδομένης και της μη σημαντικής περιεκτικότητας αυτού σε φαινολικά οξέα και φαινολικές ενώσεις, όπως διαπιστώθηκε ήδη από το **Κεφάλαιο 4**.

6.4 Επίδραση της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο χρόνο ανάκτησης χλωροφυλλών και εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική ικανότητα

Έντονη επίδραση είχε η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στην παράμετρο t_{95} και πιο συγκεκριμένα αυξημένοι εφαρμοζόμενοι παλμοί οδηγούσαν σε μείωση της παραμέτρου. Να σημειωθεί πως, μικρότεροι χρόνοι t_{95} , δεν συνεπάγονται επιτάχυνση της διεργασίας της

εκχύλισης. Η παράμετρος t_{95} χρησιμοποιείται για να δείξει τον χρόνο εκχύλισης κατά τον οποίο το ποσοστό ανάκτησης των χλωροφυλλών ή αντιοξειδωτικών ισούται με το 95 % του C_e , ή $TEAC_e$ από μία εκχύλιση αναφοράς (δείγματα control). Ελάχιστα του χρόνου t_{95} παρατηρήθηκαν στη συνθήκη PEF600 και PEF1000, τόσο στην περίπτωση ανάκτησης χλωροφυλλών όσο και στην παραλαβή εκχυλισμάτων με έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα.

6.5 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης στην εκλεκτικότητα αυτής ως προς τις χλωροφύλλες και τη λουτεΐνη

Αξιοσημείωτη είναι η επιλεκτικότητα της εκχύλισης ως προς τις χλωροφύλλες μεταξύ τους, αλλά και ως προς τη λουτεΐνη έναντι των χλωροφυλλών. Αφού μετρήθηκαν οι λόγοι $\frac{C_\alpha}{C_\beta}$ και $\frac{lut}{C_\alpha + C_\beta}$, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μειωνόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, ο λόγος $\frac{C_\alpha}{C_\beta}$ μειώνεται, υποδεικνύοντας την αύξηση της χλωροφύλλης β στο εκχύλισμα με περιεκτικότητα 75 %, σε σχέση με την αντίστοιχη ποσότητα αυτής στα εκχυλίσματα με 95 % και 85 % περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Η χλωροφύλλη β είναι περισσότερο ευδιάλυτη στο νερό, απ' ό,τι σε οργανικούς διαλύτες εξαιτίας της παρουσίας φορμουλομάδας στο μόριο της. Ο λόγος $\frac{lut}{C_\alpha + C_\beta}$, από την άλλη αυξάνεται με τη μείωση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή 1.07 ± 0.03 στη συνθήκη PEF1000, σε θερμοκρασία 60°C και περιεκτικότητα 75 % σε αιθανόλη. Επίσης, η θερμοκρασία των 60°C και η χαμηλή περιεκτικότητα 75 % σε αιθανόλη κατ' όγκο, ενέχει τον κίνδυνο υποβάθμισης των χλωροφυλλών, όπως έχει προαναφερθεί, λόγω της θερμότητας και της παρουσίας νερού σε ποσοστό ανώτερο του 10 % στο διαλύτη. Στην ίδια συνθήκη και για παλμούς υψηλότερους των 300, το εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, επομένως και λουτεΐνη, αφού αυτή προσδίδει την αντιοξειδωτική δράση στο εκχύλισμα.

6.6 Επίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης και της προκατεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία στο ξηρό βάρος του εκχυλίσματος

Η προεπεξεργασία των κυττάρων του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*, ο χρόνος εκχύλισης μετά την μία ώρα, καθώς και η περιεκτικότητα της αιθανόλης του διαλύτη της εκχύλισης δεν επιδρούν σημαντικά στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων. Αυτό δεν είναι παράδοξο, γιατί εκτός από τις χρωστικές ουσίες, χλωροφύλλες και καροτενοειδή, το εκχύλισμα περιέχει και άλλα ενδοκυτταρικά συστατικά, τα οποία ενδεχομένως περνούν στο

εκχύλισμα . Έτσι, η μόνη παράμετρος που επιδρά στο ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων είναι η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, άλλωστε, ευνοείται η εκχυλισιμότητα των ενδοκυτταρικών ουσιών, εφόσον το κυτταρικό περίβλημα γίνεται πιο διαπερατό. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα παραπάνω οδηγεί στο συμπέρασμα πως η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιφέρει την παραλαβή πλουσιότερων εκχυλισμάτων σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή, αφού μεγιστοποιούνται τα ποσοστά ανάκτησης αυτών των συστατικών.

6.7 Προτάσεις για τον βέλτιστο συνδυασμό συνθηκών εκχύλισης και επεξεργασίας με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Η επεξεργασία της βιομάζας *Chlorella pyrenoidosa* με παλμικά ηλεκτρικά πεδία έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την εκχύλιση κύριων βιοδραστικών συστατικών, είτε αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης, είτε μειώνοντας την περιεκτικότητα αιθανόλης και τη θερμοκρασία εκχύλισης, επιφέροντας μείωση του κόστους της διεργασίας. Η κλιμάκωση της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα είναι πρακτικά υποσχόμενη καθώς ο εξοπλισμός παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι διαθέσιμος και εφαρμόζεται σε τέτοιου μεγέθους κλίμακα. Η μείωση κόστους υλικών, η εξοικονόμηση ενέργειας και χρόνου και η φιλικότητα προς το περιβάλλον θα πρέπει να επιβεβαιωθούν ποσοτικά με τεχνοοικονομική ανάλυση και ανάλυση κύκλου ζωής και αναμένονται σημαντικά.

6.8 Προτάσεις για μελλοντική μελέτη

Εφόσον η κινητική ανάκτησης χλωροφυλλών και αντιοξειδωτικών του εκχυλίσματος του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* μελετήθηκαν και τεκμηριώθηκαν, θα μπορούσε να μελετηθεί η σταθερότητά τους ως προς τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης αυτών. Θα μπορούσε, επίσης, να εξεταστεί η απομάκρυνση του διαλύτη με περιστροφική εξάτμιση, καθώς και η μετέπειτα ξήρανση αυτού με τη μέθοδο της ξήρανσης υπό κατάψυξη, με την προγενέστερη εφαρμογή της διεργασίας σε ένα σύστημα μοντέλο και μετά σε κάποιο τρόφιμο. Στόχος της περαιτέρω μελέτης του φαινομένου της παραλαβής βιοδραστικών συστατικών από το εκχύλισμα της ξηρής βιομάζας του συγκεκριμένου μικροφύκου, θα είναι η προστασία των επιμέρους τροφίμων από την οξείδωση και η επιτυχία βελτιωμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ως προς το χρώμα και τη γεύση αυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Becker, E. W. 2007. "Micro-Algae as a Source of Protein." *Biotechnology Advances* 25 (2): 207–10.
- Brennan, Liam, and Philip Owende. 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): 557–77.
- Chisti, Yusuf, and Murray Moo-Young. 1986. "Disruption of Microbial Cells for Intracellular Products," 194–204.
- Cho, Hyeon Soo, You Kwan Oh, Soon Chul Park, Jae Wook Lee, and Ji Yeon Park. 2013. "Effects of Enzymatic Hydrolysis on Lipid Extraction from *Chlorella Vulgaris*." *Renewable Energy* 54: 156–60.
- Chopin, T., and M. Sawhney. 2009. "Seaweeds and Their Mariculture." *Encyclopedia of Ocean Sciences: Second Edition*, no. October: 317–26.
- Deenu, Aree, Srisuwan Naruenartwongsakul, and Sang Moo Kim. 2013. "Optimization and Economic Evaluation of Ultrasound Extraction of Lutein from *Chlorella Vulgaris*." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18 (6): 1151–62.
- Dvoretzky, Dmitry S, Eugeny Akulinin, Mikhail Temnov, Assoc D Dvoretzky, Ass EAkulinin, S Dvoretzky, student M Temnov, and Master A student Androsova. 2016. "DEFINING OPTIMAL CONDITIONS FOR CHLORELLA VULGARIS MICROALGAE BIOMASS CELL WALLS DISRUPTION IN THE PROCESS OF BIOFUEL PRODUCTION Purification Treatment of Municipal Wastewater Using Microalgae *Chlorella Vulgaris* View Project Renewable Energy Sources and C," no. August.
- Enamala, Manoj Kumar, Swapnika Enamala, Murthy Chavali, Jagadish Donepudi, Rajasri Yadavalli, Bhulakshmi Kolapalli, Tirumala Vasu Aradhyula, Jeevitha Velpuri, and Chandrasekhar Kuppam. 2018. "Production of Biofuels from Microalgae - A Review on Cultivation, Harvesting, Lipid Extraction, and Numerous Applications of Microalgae." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94 (May 2017): 49–68.
- Fan, Xiao Dan, Yan Hou, Xing Xin Huang, Tai Qiu Qiu, and Jian Guo Jiang. 2015. "Ultrasound-Enhanced Subcritical CO₂ Extraction of Lutein from *Chlorella Pyrenoidosa*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (18): 4597–4605.

- Halim, Ronald, Aris Hosikian, Su Lim, and Michael K. Danquah. 2010. "Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects." *International Journal of Chemical Engineering* 2010.
- Jeevanandam, Jaison, Vandana Choudhary, Jaya Divya Selvam, and Michael K. Danquah. 2020. *The Bioeconomy of Production of Microalgal Pigments. Pigments from Microalgae Handbook*.
- Jitan, Samar Al, Saeed A. Alkhoori, and Lina F. Yousef. 2018. *Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. Studies in Natural Products Chemistry*. 1st ed. Vol. 58. Elsevier B.V.
- Kay, Robert A., and Larry L. Barton. 1991. "Microalgae as Food and Supplement." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30 (6): 555–73.
- Kwang, Hyun Cha, Hee Ju Lee, Song Yi Koo, Dae Geun Song, Dong Un Lee, and Cheol Ho Pan. 2010. "Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella Vulgaris*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2): 793–97.
- Liang, Yanna, Nicolas Sarkany, and Yi Cui. 2009. "Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella Vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions." *Biotechnology Letters* 31 (7): 1043–49.
- Lichtenthaler, Hartmut K. 1987. "Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes." *Methods in Enzymology* 148 (C): 350–82.
- Luengo, Elisa, Santiago Condón-Abanto, Ignacio Álvarez, and Javier Raso. 2014. "Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella Vulgaris*." *Journal of Membrane Biology* 247 (12): 1269–77.
- Luengo, Elisa, Juan Manuel Martínez, Andrea Bordetas, Ignacio Álvarez, and Javier Raso. 2015. "Influence of the Treatment Medium Temperature on Lutein Extraction Assisted by Pulsed Electric Fields from *Chlorella Vulgaris*." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 29: 15–22.
- MacDougall, Karen M., Jesse McNichol, Patrick J. McGinn, Stephen J.B. O'Leary, and Jeremy E. Melanson. 2011. "Triacylglycerol Profiling of Microalgae Strains for Biofuel Feedstock by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401 (8): 2609–16.

- Mobin, Saleh M.A., Harun Chowdhury, and Firoz Alam. 2019. "Commercially Important Bioproducts from Microalgae and Their Current Applications-A Review." *Energy Procedia* 160 (2018): 752–60.
- Molina, E., J. Fernández, F. G. Acién, and Y. Chisti. 2001. "Tubular Photobioreactor Design for Algal Cultures." *Journal of Biotechnology* 92 (2): 113–31.
- Mulchandani, Ketan, Jayaranjan R. Kar, and Rekha S. Singhal. 2015. "Extraction of Lipids from *Chlorella Saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176 (6): 1613–26.
- Pagels, Fernando, Ricardo N. Pereira, António A. Vicente, and A. Catarina Guedes. 2018. "Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-a Review on Current Methodologies." *Applied Sciences (Switzerland)* 11 (11).
- Pataro, Gianpiero, Martina Goettel, Ralf Straessner, Christian Gusbeth, Giovanna Ferrari, and Wolfgang Frey. 2017. "Effect of PEF Treatment on Extraction of Valuable Compounds from Microalgae *C. Vulgaris*." *Chemical Engineering Transactions* 57: 67–72.
- Puértolas, E., E. Luengo, I. Álvarez, and J. Raso. 2012. "Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications." *Annual Review of Food Science and Technology* 3 (1): 263–82.
- Safi, Carl, Bachar Zebib, Othmane Merah, Pierre Yves Pontalier, and Carlos Vaca-Garcia. 2014. "Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265–78.
- Sara, Martillanes, Javier Rocha-Pimienta, Manuel Cabrera-Banegil, Daniel Martin-Vertedor, and Jonathan Delgado-Adamez. 2016. "Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging." *Intech i (tourism)*: 13.
- Scherer, Daniel, Damaris Krust, Wolfgang Frey, Georg Mueller, Peter Nick, and Christian Gusbeth. 2019. "Pulsed Electric Field (PEF)-Assisted Protein Recovery from *Chlorella Vulgaris* Is Mediated by an Enzymatic Process after Cell Death." *Algal Research* 41 (November 2018): 101536.
- Schieler, Leroy, Lawrence E McClure, and M A X S Dunn. 1953. "THE AMINO ACID COMPOSITION OF *CHLORELLA*," no. 1: 377–80.
- Show, Kuan Yeow, Duu Jong Lee, Joo Hwa Tay, Tse Min Lee, and Jo Shu Chang. 2015.

- “Microalgal Drying and Cell Disruption - Recent Advances.” *Bioresource Technology* 184: 258–66.
- Shrotri, Abhijit, Hirokazu Kobayashi, and Atsushi Fukuoka. 2017. *Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. Advances in Catalysis*. 1st ed. Vol. 60. Elsevier Inc.
- Solymosi, Katalin, and Beata Mysliwa-Kurziel. 2016. “Chlorophylls and Their Derivatives Used in Food Industry and Medicine.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 17 (13).
- Vale, Miguel A., António Ferreira, José C.M. Pires, and Ana L. Gonçalves. 2020. “CO₂ Capture Using Microalgae.” *Advances in Carbon Capture*, 381–405.
- Wan Mahmood, Wan M.Asyraf, Atiwich Lorwirachsutee, Constantinos Theodoropoulos, and Maria Gonzalez-Miquel. 2019. “Polyol-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Natural Polyphenolic Antioxidants from *Chlorella Vulgaris*.” Research-article. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 7 (5): 5018–26.
- Xiong, Wei, Xiufeng Li, Jinyi Xiang, and Qingyu Wu. 2008. “High-Density Fermentation of Microalga *Chlorella Protothecoides* in Bioreactor for Microbio-Diesel Production.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (1): 29–36.
- Αγγελής. 2007. Στοιχεία Μικροβιολογίας και Βιοχημείας των Βιομηχανικών Ζυμώνσεων. Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία, 1^η έκδοση.
- Βάσσου Μιχάλης. 2017. “Ανάπτυξη Του Μικροφύκου *Chlorella vulgaris* Σε Βιοαέριο Και Αξιοποίηση Της Ανακτώμενης Βιομάζας Για Την Παραγωγή Βιοκαυσίμων – Κλείνοντας Τον Κύκλο Του Άνθρακα.”
- ΕΛ.Φ.Ε, Ελληνική Φυκολογική Εταιρεία. 2008. “Μία Βουτιά, Μία Ματιά Στους Κήπους Του Νερού, Γνωρίζοντας Τα Φύκη.”
- Τζίμα Σ. 2020. “Εφαρμογή Της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης Για Την Ανάκτηση Συστατικών Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας Από Καλλιέργειες Μικροφυκών.”