



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

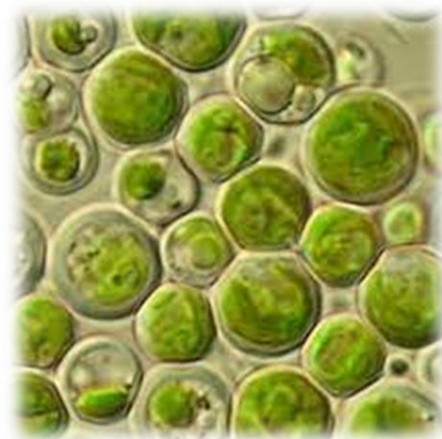
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

Ανάκτηση πρωτεϊνών από κύτταρα μικροφύκους *Chlorella pyrenoidosa* με εφαρμογή Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης (HPH)

Καρβέλη Ιουλία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων: ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ,
Καθηγητής Ε.Μ.Π.



Αθήνα, 2022

Πρόλογος

Το παρόν πόνημα αποτελεί την διπλωματική εργασία της προπτυχιακής φοιτήτριας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Καρβέλη Ιουλίας. Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Πέτρου Ταούκη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την συνεργασία μας, για την καθοδήγηση του, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφερε καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Μαρία Γιαννακούρου, τον Διδάκτορα Γεώργιο Δημόπουλο, τον Υποψήφιο Διδάκτορα Αλέξανδρο Βασίλειο Κατσιμίχα και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Αθανάσιο Λημναίο, για την σπουδαία βοήθεια, την καθοδήγηση και την στήριξη κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης,

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω ένα θερμό ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, αλληλεγγύης και ομαδικότητας που δημιούργησαν.

Ακόμα, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους υπέροχους φίλους μου που με στήριξαν, έκαναν την πενταετία της φοίτησης μου ξεχωριστή και την γέμισαν με όμορφες στιγμές, που δεν θα ξεχαστούν ποτέ. Τέλος, μέσα από την καρδιά μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία με στήριξε και συνεχίζει να με στηρίζει σε κάθε μου βήμα, καθώς χωρίς αυτή δεν θα μπορούσα να βρίσκομαι στο σημείο που είμαι σήμερα.

Σε όλους εσάς,

Ευχαριστώ!

Καρβέλη Ιουλία,

Σεπτέμβρης, 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν κύρια συστατικά της διατροφής του ανθρώπου και η πρόσληψή τους σε επαρκείς ποσότητες είναι καίριας σημασίας, καθώς αυτές επιτελούν βασικές ζωτικές διαδικασίες στον οργανισμό. Πέρα όμως από την ποσότητα, σημασία έχει και η βιολογική αξία των πρωτεϊνών, δηλαδή το περιεχόμενο τους σε απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία ο άνθρωπος δεν μπορεί να συνθέσει. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες είναι συστατικά υψηλού ενδιαφέροντος και για τις βιομηχανίες, καθώς λόγω ποικίλων λειτουργικών ιδιοτήτων τους, όπως η ικανότητα συγκράτησης νερού ή ελαίου, η γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα κ.α. προσδίδουν επιθυμητές ιδιότητες σε προϊόντα. Έτσι, η ανάγκη για ποιοτικού περιεχομένου πρωτεΐνες σε συνδυασμό με την ανάγκη κατανάλωσης βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον πρώτων υλών, έχει στρέψει, σήμερα, το ενδιαφέρον προς τις φυτικές πηγές πρωτεϊνών. Σε αυτό το πλαίσιο, τα μικροφύκη αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική, λόγω της ευελιξίας τους στην ανάπτυξη, της ικανότητάς τους να δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες CO_2 , καθώς πραγματοποιούν φωτοσύνθεση, και του πλούσιου πρωτεϊνικού τους περιεχομένου. Ειδικότερα, ένα μικροφύκος που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς περίπου το 50% της ξηρής του βιομάζας είναι πρωτεϊνικού χαρακτήρα είναι η *Chlorella pyrenoidosa*.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η σημασία της ανάκτησης των πρωτεϊνών από το κύτταρο των μικροφυκών, διαδικασία η οποία μπορεί να γίνει πολύ απαιτητική λόγω του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης που περιβάλλουν τα κύτταρα. Για την παραλαβή, επομένως των πρωτεϊνών έχουν επιστρατευτεί πολλές τεχνικές διάρρηξης του κυττάρου των μικροφυκών, τόσο μηχανικές, όσο χημικές και βιολογικές. Από το σύνολο των τεχνικών, η Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (High Pressure Homogenization, HPH), φαίνεται να είναι η αποτελεσματικότερη για την παραλαβή των συγκεκριμένων συστατικών. Παράλληλα, όμως, με την HPH ένα υδατικό μέσο αλκαλικού χαρακτήρα ευνοεί επίσης την εκχύλιση των πρωτεϊνών, όπως έχει φανεί βιβλιογραφικά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάκτηση πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*. Πιο συγκεκριμένα, αιώρημα 2.5% w/w των κυττάρων του μικροφύκου, σε ξηρή μορφή σε απιονισμένο νερό, υποβλήθηκε σε Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (HPH), ως μέθοδο διάρρηξης των κυττάρων και μετά την επεξεργασία ρυθμίστηκε το pH του αιωρήματος στην τιμή 13, ως η βέλτιστη τιμή διάλυσης των πρωτεϊνών, ενώ στην συνέχεια ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων σε υδατόλουτρο έως και για 24h, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των πρωτεϊνών. Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της έντασης της επεξεργασίας με HPH και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην κινητική ανάκτησης των πρωτεϊνών μελετήθηκαν 6 συνθήκες επεξεργασίας, οι οποίες διαφοροποιούνταν στην πίεση επεξεργασίας (400, 600, 800 bar) και τον αριθμό διελεύσεων (1 και 4) από τον Ομογενοποιητή και 3 θερμοκρασίες εκχύλισης (20 °C, 30 °C και 40 °C). Παράλληλα, μελετήθηκε και μια ακραία συνθήκη επεξεργασίας (800 bar και 10 διελεύσεις), η οποία θεωρείται ότι προκαλεί πλήρη διάρρηξη του κυττάρου και γι' αυτό η τιμή $435.33 \pm 14.43 \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$ που προέκυψε για την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες μετά από αυτή την επεξεργασία και μετά από εκχύλιση για 24 h στους 40 °C, θεωρείται ότι είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που περιέχει το

κύτταρο. Από τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, η συνθήκη επεξεργασίας με πίεση 800 bar και 4 διελεύσεις, και εκχύλιση στους 40 °C, αποδείχτηκε η πιο αποδοτική, με τελική ανάκτηση πρωτεϊνών $406.3 \pm 4.8 \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$.

Τα πειραματικά αποτελέσματα της ανάκτησης των πρωτεϊνών με τον χρόνο εκχύλισης, στην συνέχεια, περιγράφηκαν μαθηματικά με την σχέση $C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$ και από την στατιστική τους επεξεργασίας με ανάλυση ANOVA, διαπιστώθηκε πως εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στην τελικά ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών ανάλογα με την ένταση της επεξεργασίας και την θερμοκρασία εκχύλισης. Η μέγιστη συγκέντρωση ανακτημένων πρωτεϊνών στους 40 °C με την επεξεργασία στα 800 bar και με 4 διελεύσεις αυξήθηκε κατά 264%, συγκρινόμενη με το ανεπεξέργαστο δείγμα Control.

Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας την σχέση $C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$ και εκφράζοντας τις παραμέτρους της ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T), $C_e, \tau = f(T, P)$ και $C_o = f(T)$, για κάθε μια από τις περιπτώσεις (1 και 4 διελεύσεων), προέκυψε ένα συνολικό μοντέλο πρόβλεψης της συγκέντρωσης των ανακτημένων πρωτεϊνών ως συνάρτηση των T και P. Καθώς μαζί με τις πρωτεΐνες εκχυλίζονται και άλλα συστατικά, στην συνέχεια έγινε προσδιορισμός των υδατανθράκων και των χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα. Όσον αφορά στους υδατάνθρακες, η εκχύλιση τους φάνηκε πως επηρεάζεται από την ένταση της επεξεργασίας με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης αλλά όχι από τη θερμοκρασία εκχύλισης και η μέγιστη ανάκτηση τους επιτεύχθηκε με τη συνθήκη επεξεργασίας στα 800 bar και με 4 διελεύσεις και έχει την τιμή $129.8 \pm 7.9 \left(\frac{mg \text{ υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$. Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση τους πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα ενώ φαίνεται πως ήδη από τον χρόνο εκχύλισης $t=0$ το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων έχει εκχυλιστεί. Όσον αφορά στις χλωροφύλλες, η εκχύλιση τους πραγματοποιήθηκε σε αιθανόλη και οι θερμοκρασίες εκχύλισης που εξετάστηκαν, μετά την επεξεργασία με HPH, ήταν 30°C, 40°C, 50°C και 60°C. Όπως παρατηρήθηκε, η εκχύλιση τους πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, και συγκεκριμένα σε χρόνο εκχύλισης 2h έχει ανακτηθεί τουλάχιστον το 90% της τελικής απόδοσης, ενώ από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τόσο η ένταση της επεξεργασίας όσο και η θερμοκρασία εκχύλισης των δειγμάτων επιδρούν στην εκχύλιση τους. Η ευνοϊκότερη συνθήκη επεξεργασίας για την παραλαβή χλωροφυλλών ήταν τα 800 bar με 4 διελεύσεις σε θερμοκρασία εκχύλισης 60°C, κατά την οποία παραλήφθηκαν $16.3 \pm 1.1 \left(\frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$.

Όπως γίνεται αντιληπτό, τα εκχυλίσματα περιλαμβάνουν σημαντικές ποσότητες υδατανθράκων και χλωροφυλλών, επομένως είναι καίρια μια επεξεργασία για την παραλαβή όσο το δυνατόν καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων. Για αυτό τον σκοπό, πραγματοποιήθηκε ένας συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης μετά την επεξεργασία με HPH. Για αυτό το σκέλος του πειράματος, επιλέχθηκαν να μελετηθούν 2 συνθήκες επεξεργασίας, η συνθήκη των 800 bar με 4 διελεύσεις, ως η αποδοτικότερη συνθήκη επεξεργασίας και η συνθήκη των 600 bar με 4 διελεύσεις, ως μια συνθήκη επεξεργασίας ικανοποιητικής απόδοσης. Όσον αφορά στις θερμοκρασίες εκχύλισης, επιλέχθηκαν οι πιο αποδοτικές όπως προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα, δηλαδή οι 40°C για την υδατική εκχύλιση και οι 60°C για την αιθανολική εκχύλιση.

Με αυτή την μέθοδο, για την επεξεργασία 800/4 επιτεύχθηκε περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες ίση με $764.7 \pm 4.4 \left(\frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$, περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες ίση με $40.9 \pm 2.7 \left(\frac{\text{mg υδατανθράκων}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$ και περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε χλωροφύλλες ίση με $4.67 \pm 0.97 \left(\frac{\text{mg χλωροφυλλών}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$, έναντι των αντίστοιχων περιεκτικότητων που επιτυγχάνονται μετά από υδατική εκχύλιση, $183.8 \pm 1.4 \left(\frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$, $183.8 \pm 1.4 \left(\frac{\text{mg υδατανθράκων}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$ και $12.2 \pm 0.33 \left(\frac{\text{mg χλωροφυλλών}}{\text{g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος}} \right)$. Συνολικά, συμπεραίνεται πως με τον συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης παραλαμβάνονται καθαρότερα σε πρωτεΐνες εκχυλίσματα, τα οποία μάλιστα με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας με ΗΡΗ εμπλουτίζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά τους παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα.

Protein recovery from microalgae *Chlorella pyrenoidosa* cell enhanced by High Pressure Homogenization (HPH)

Proteins are main components of human diet and their intake in sufficient amounts is of high importance, as they perform basic vital processes in the organism. Besides the amount of protein an organism should take on, the biological value of the proteins, or in other words, their content in essential amino acids, is, also, an important factor for human diet. At the same time, proteins are components of great interest for industries due to their functional properties, such as their water holding and oil holding capacity, their emulsifying properties etc., that contribute to desirable properties in products. Thus, the need for proteins of superior quality in combination with the increasing interest in consuming more sustainable and environmentally friendly proteins, has focused the scientific interest towards plant-based protein sources. In this context, microalgae are a promising alternative, due to their flexible growing needs, their ability to bind CO_2 , as they perform photosynthesis, and their rich protein content. In particular, a microalgae that is of special interest, is *Chlorella pyrenoidosa*, as approximately 50% of its dry biomass is proteins.

Based on the abovementioned observations, it is important to recover the proteins from the microalgae cell, although this process may be challenging due to the difficulties encountered by the cell wall and the cell membrane resistance. In order to obtain the proteins, many techniques, both mechanical and biochemical ones, have been employed to disrupt the cell. Among all the techniques, High Pressure Homogenization (HPH), seems to be the most efficient for the recovery of this particular compounds. Alongside with HPH, it has been demonstrated that an aquatic medium of alkaline nature favors the extraction of proteins.

In this diploma thesis, the recovery of proteins from the cell of the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* has been studied. More specifically, a 2.5% w/w suspension of microalgae cells, in dry form in deionized water has been prepared and subjected to High Pressure Homogenization. After the disruption treatment, the pH of the suspension has been adjusted to 13, as the optimal for the dissolution of the proteins. Then the samples were incubated for 24h in a water bath. To evaluate the effect of the HPH treatment and the effect of the incubation temperature on the kinetics of protein recovery, 6 HPH treatment conditions were investigated, as far as the pressure is concerned (400, 600, 800 bar) the number of passes (1 and 4) and the incubation temperature (20 °C, 30 °C και 40 °C). To evaluate the total protein content of the microalgae *C. pyrenoidosa* the extreme HPH condition treatment of 800 bar and 10 passes was performed and the sample was incubated for 24 h at 40 °C. From this treatment the total protein content was estimated at $435.33 \pm 14.43 \left(\frac{mg \text{ proteins}}{g \text{ dry biomass}} \right)$. Regarding the investigated treatment conditions, the most efficient one turned out to be the 800 bar with 4 passes, at the incubation temperature of 40 °C, from which the final protein recovery was $406.3 \pm 4.8 \left(\frac{mg \text{ proteins}}{g \text{ dry biomass}} \right)$.

The experimental results of the evolution of the protein recovery from *C. pyrenoidosa* cell with the incubation time were, then, modeled according to the relationship $C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$ and after statistical analysis with the ANOVA test, it was found that there are significant differences in the final protein recovery rates depending on the intensity of the HPH treatment and the incubation temperature. It is characteristically reported that the maximum percentage of extracted proteins at 40 °C with the treatment of 800 bar and 4 passes increased by 264%, compared to the untreated sample, called Control.

Then, by using the relation $C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$ and by expressing the model's parameters as a function of the treatment's pressure (P) and the incubation temperature (T), $C_e, \tau = f(T, P)$ and $C_o = f(T)$, for each of the two cases of 1 and 4 passes, an integrated model for predicting the protein recovery rate as a function of T and P was obtained. As other components are extracted along with the proteins, the carbohydrate and total chlorophyll content in the extracts were determined. As far as carbohydrates are concerned, their extraction seemed to be affected by the intensity of the treatment with HPH, but not by the incubation temperature. The maximum recovery of carbohydrates was achieved with the condition treatment of 800 bar and 4 passes and assumes the value of $129.8 \pm 7.9 \left(\frac{mg \text{ carbohydrates}}{g \text{ dry biomass}} \right)$. It was, also, observed that their extraction takes place in a short period of time, while it seems that from the extraction time $t=0$, the largest percentage of carbohydrates has been already extracted. As for the chlorophylls the extraction medium used was ethanol and the incubation temperatures studied after the HPH treatment were 30°C, 40°C, 50°C and 60°C. As it was observed, their extraction is carried out in a short period of time, and specifically after the first 2h of the extraction at least 90% of the final recovered percentage has been recovered, while according to the experimental results it is concluded that both the intensity of the HPH treatment and the incubation temperature of the samples affect their extraction. The most favorable treatment condition for the extraction of chlorophylls was the 800 bar with 4 passes at an incubation temperature of 60 °C, during which $16.3 \pm 1.1 \left(\frac{mg \text{ chlorophylls}}{g \text{ dry biomass}} \right)$ was obtained.

As it is already discussed, the extracts contain significant amounts of carbohydrates and chlorophylls. Therefore, an appropriate pretreatment is essential, to obtain protein extracts as pure as possible. For this purpose, a combination of ethanolic and aqueous extraction was performed after the HPH treatment. For this part of the experiment, 2 conditions were chosen, the 800 bar and 4 passes condition, as the most efficient one, and the 600 bar and 4 passes condition as a condition leading to satisfactory recovery. Regarding the incubation temperatures chosen for this part of the experiment, the most efficient ones, as detected from the previous experiments, were selected. That is 40°C for the aqueous extraction and 60°C for the ethanolic extraction. With this method, the protein content of the extracts obtained after the 800/4 treatment was $764.7 \pm 4.4 \left(\frac{mg \text{ proteins}}{g \text{ dry weight of extract}} \right)$, the carbohydrate content was $40.9 \pm 2.7 \left(\frac{mg \text{ carbohydrates}}{g \text{ dry weight of extract}} \right)$ and the chlorophylls content was $4.67 \pm 0.97 \left(\frac{mg \text{ chlorophylls}}{g \text{ dry weight of extract}} \right)$, over the corresponding contents obtained from the aqueous extraction, that is $183.8 \pm 1.4 \left(\frac{mg \text{ proteins}}{g \text{ dry weight of extract}} \right)$ for the

protein content, $183.8 \pm 1.4 \left(\frac{\text{mg carbohydrates}}{\text{g dry weight of extract}} \right)$ for the carbohydrate content and $12.2 \pm 0.33 \left(\frac{\text{mg chlorophylls}}{\text{g dry weight of extract}} \right)$ for the chlorophylls content. Overall, it can be concluded that with this method, purer protein extracts were obtained, which are further enriched in proteins as the intensity of the HPH treatment is increased, while the rest of the extract's components remain at low level.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Μικροφύκη.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Ταξινόμηση μικροφυκών	2
1.2.1 Ευγενόφυτα	2
1.2.2 Χρυσόφυτα	2
1.2.3 Ροδόφυτα.....	2
1.2.4 Φαιόφυτα	3
1.2.5 Πυρόφυτα	3
1.2.6 Ξανθόφυτα.....	3
1.2.7 Χλωρόφυτα	3
1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών	4
1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών	4
1.4.1 Μέθοδοι ανάπτυξης καλλιέργειας μικροφυκών	4
1.4.1.1 Αυτότροφη καλλιέργεια	4
1.4.1.2 Ετερότροφη καλλιέργεια	5
1.4.1.3 Μιξότροφη καλλιέργεια	5
1.4.2 Συστήματα καλλιέργειας	6
1.4.2.1 Ανοιχτού τύπου.....	7
1.4.2.2 Κλειστού τύπου – Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs).....	8
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη.....	9
1.5.1 Θερμοκρασία	9
1.5.2 pH.....	9
1.5.3 Φως	9
1.5.4 Θρεπτικά συστατικά (C, P, N)	10
1.5.4.1 Άνθρακας	10
1.5.4.2 Άζωτο	10
1.5.4.3 Φώσφορος	11
1.5.4.4 Άλλα θρεπτικά συστατικά.....	11
1.6 Εφαρμογές και οφέλη των βιοδραστικών συστατικών των μικροφυκών.....	11
1.7 Σύνοψη.....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	13
2.1 Εισαγωγή.....	14
2.2 Δομή του κυττάρου του μικροφύκου <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	14
2.2.1 Μορφολογία του κυττάρου	14
2.2.1.1 Κυτταρικό τοίχωμα	14
2.2.1.2 Κυτταρική μεμβράνη	15
2.2.1.3 Κυτόπλασμα.....	15
2.2.1.4 Μιτοχόνδριο	15
2.2.1.5 Χλωροπλάστης.....	15
2.3 Αναπαραγωγή.....	16
2.4 Χρήσιμα συστατικά του μικροφύκου <i>C. pyrenoidosa</i>	16
2.4.1 Πρωτεΐνες.....	16
2.4.1.1 Προφίλ των αμινοξέων	16
2.4.1.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου	17
2.4.1.3 Ικανότητα αφρισμού και σταθερότητα του αφρού	18
2.4.2 Λιπαρά	18
2.4.3 Υδατάνθρακες.....	18
2.4.4 Χρωστικές.....	19
2.4.5 Μέταλλα.....	19
2.4.6 Βιταμίνες.....	19
2.5 Σύνοψη.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης.....	20
3.1 Εισαγωγή.....	21
3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μη μηχανικές μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης.....	21
3.2.1 Χημικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης.....	21
3.2.1.1 Οξέα – Βάσεις	21
3.2.1.2 Ιονικά διαλύματα.....	21
3.2.1.3 Οξειδωση	22
3.2.1.4 Επιφανειοδραστικές ουσίες (Surfactant)	22
3.2.2 Βιολογικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης.....	22
3.2.2.1 Ενζυμική υδρόλυση	22
3.2.2.2 Χρήση μικροοργανισμών.....	22
3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μηχανικές μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης.....	22

3.3.1 Με προσφορά ενέργειας μέσω κυμάτων.....	23
3.3.1.1 Επεξεργασία με υπερήχους.....	23
3.3.1.2 Επεξεργασία με μικροκύματα	23
3.3.1.3 Εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF)	23
3.3.2 Διάρρηξη με θερμικές μεθόδους.....	23
3.3.2.1 Έκρηξη ατμού (Steam explosion).....	23
3.3.2.2 Λυοφιλίωση (Freeze drying)	24
3.3.3 Με εφαρμογή διατμητικής τάσης	24
3.3.3.1 Άλεση με σφαιρίδια (Bead milling).....	24
3.3.3.2 Υδροδυναμική σπηλαίωση	24
3.3.3.3 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (HPH)	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά & Μέθοδοι.....	31
4.1 Εισαγωγή.....	32
4.2 Παρασκευή αιωρήματος κυττάρων μικροφύκους <i>Chlorella pyrenoidosa</i> 2.5 % w/w	32
4.3 Επεξεργασία αιωρήματος με Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης	32
4.4 Υδατική εκχύλιση	33
4.4.1 Ρύθμιση pH	33
4.4.2 Εκχύλιση δειγμάτων	34
4.4.3 Φυγοκέντρηση	34
4.4.4 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες.....	34
4.4.5 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων πρωτεϊνών	35
4.4.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες	35
4.4.7 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων υδατανθράκων.....	36
4.5 Αιθανολική εκχύλιση	36
4.5.1 Εκχύλιση δειγμάτων	36
4.5.2 Προσδιορισμός ανακτημένων χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα	37
4.5.3 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων χλωροφυλλών	37
4.6 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος των εκχυλισμάτων.....	37
4.7 Συνδυαστικό πείραμα.....	39
4.8 Μαθηματική μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων	41
4.8.1 Πρωτεΐνες.....	41
4.8.2 Συνολικό μοντέλο για την πρόβλεψη της ανακτώμενης συγκέντρωσης εκχυλισμένων πρωτεϊνών με βάση την πίεση επεξεργασίας (P), την θερμοκρασία (T) και τον χρόνο εκχύλισης (t)	42

4.8.2.1 Συσχέτιση της πίεσης επεξεργασίας (P) και των παραμέτρων του μοντέλου C_e , C_o και τ	42
4.8.2.2 Εξίσωση Arrhenius	42
4.9 Στατιστική ανάλυση	43
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων	44
5.1 Εισαγωγή.....	45
5.2 Χαρακτηρισμός πρώτης ύλης	45
5.2.1 Πρωτεΐνες.....	46
5.2.1.1 Μελέτη της κινητικής ανάκτησης των πρωτεϊνών	47
5.2.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στην τελικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, C_e ,σύμφωνα με το μοντέλο	51
5.2.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στην ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, C_o ,για χρόνο $t=0$, σύμφωνα με το μοντέλο	52
5.2.1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στον χαρακτηριστικό χρόνο τ του μοντέλου	53
5.2.1.5 Ανακεφαλαίωση	53
5.2.1.6 Εξαγωγή συνολικού μοντέλου πρόβλεψης της ανακτημένης συγκέντρωσης από την πίεση της επεξεργασίας, τον χρόνο εκχύλισης και την θερμοκρασία εκχύλισης	54
5.2.1.6.1 Επεξεργασία με ένα (1) πέρασμα.....	54
5.2.1.6.2 Επεξεργασία με τέσσερα (4) περάσματα	61
5.2.2 Υδατάνθρακες.....	67
5.2.3 Χλωροφύλλες.....	70
5.3 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος εκχυλισμάτων.....	73
5.4 Συνδυαστικό πείραμα.....	75
5.4.1 Εισαγωγή.....	75
5.4.2 Σύγκριση βαθμού ανάκτησης πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου <i>C.pyrenoidosa</i> με υδατική εκχύλιση και με συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	75
5.4.3 Ανακεφαλαίωση	79
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα.....	80
6.1 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην τελικά ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, C_e	81
6.2 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH στην ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, C_o , στον χρόνο $t=0$	82
6.3 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH στον χαρακτηριστικό χρόνο, τ	82

6.4 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο ΗΡΗ και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην παραλαβή υδατανθράκων στα εκχυλίσματα	82
6.5 Επίδραση της έντασης επεξεργασίας με την μέθοδο ΗΡΗ και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην παραλαβή χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα	82
6.6 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας συνδυασμού αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης μετά από επεξεργασία με ΗΡΗ στην παραλαβή καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων.....	83
6.7 Προτάσεις για μελλοντική μελέτη	83
Βιβλιογραφία	85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Μικροφύκη

1.1 Εισαγωγή

Η κατηγορία των φυκών αποτελεί μια ευρεία κατηγορία οργανισμών που προσομοιάζουν με φυτά και αποτελείται από τρεις βασικές υποκατηγορίες: τα κυανοβακτήρια, τα μακροφύκη και τα μικροφύκη. Εστιάζοντας στα μικροφύκη, αυτά ορίζονται ως ευκαρυωτικοί, μονοκύτταροι οργανισμοί ή οργανισμοί που αναπτύσσονται σε αποικίες και οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε γλυκό όσο και σε αλμυρό νερό, και μάλιστα σχεδόν σε οποιαδήποτε περιβαλλοντική συνθήκη, από πολύ χαμηλές θερμοκρασίες έως πολύ υψηλές (Heimann, K., and Huerlimann, R., 2015). Επιπλέον, τα μικροφύκη πραγματοποιούν φωτοσύνθεση, απορροφώντας ηλιακό φως και δεσμεύοντας μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα, παράγοντας έτσι περίπου το μισό ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Αυτό, σε συνδυασμό με το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, το οποίο διαθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, καθιστά τα μικροφύκη μια εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών με σημαντικές προοπτικές. Συγκεκριμένα, τα βασικά συστατικά των μικροφυκών είναι τα λιπαρά, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, ενώ είναι πλούσια σε χρωστικές και αντιοξειδωτικά, γεγονός που τα καθιστά μια δυννητικά βιώσιμη πηγή πρώτης ύλης για καύσιμα, τρόφιμα, χημικά, πολυμερή και φάρμακα (Rizwan M. et al, 2018).

1.2 Ταξινόμηση μικροφυκών

1.2.1 Ευγενόφυτα

Τα ευγενόφυτα είναι μονοκύτταροι, μαστιγωτοί οργανισμοί που απαντώνται κυρίως σε περιβάλλοντα γλυκού νερού, είναι γενικά άχρωμα (Gurte and Iyer, 2015) και τα κύτταρα τους δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα. Όπως όλα τα φυτά, η κατηγορία αυτή των μικροφυκών, πραγματοποιεί τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης λόγω της παρουσίας της χλωροφύλλης α και β αλλά και των καροτενοειδών, ενώ τα περισσότερα είδη αυτής της κατηγορίας τρέφονται ετερότροφα, απορροφώντας τροφή μέσω του ορίου του βλεννογόνου μέσω φαγοκυττάρωσης. Αυτή η κατηγορία μικροφυκών αναπαράγεται σεξουαλικά με κυτταρική διαίρεση (The Editors of Encyclopaedia, 2020).

1.2.2 Χρυσόφυτα

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα χρυσο-καφέ φύκη, τα οποία μπορεί να είναι μονοκύτταροι οργανισμοί ή να σχηματίζουν σύνθετες αποικίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα κυτταρικά τους τοιχώματα αποτελούνται από κυτταρίνη αλλά σε ορισμένα είδη τα κύτταρα είναι αμοιβοειδή (Myklestad and Granum, 2009). Όπως και τα ευγενόφυτα, έτσι και τα χρυσόφυτα διαθέτουν τις φωτοσυνθετικές χρωστικές χλωροφύλλη α και β. Τα μικροφύκη αυτής της κατηγορίας απαντώνται στο γλυκό νερό αλλά τα είδη *Hebetomonas* και *Acrespina* μπορούν να επιβιώσουν και να ευδοκιμήσουν και στο θαλασσινό νερό (Scoble and Cavaier – Smith, 2014, von der Heyden et al, 2004). Αυτή η κατηγορία μικροφυκών αναπαράγεται σεξουαλικά, με κυτταρική σύντηξη η οποία ακολουθείται από εγκύστωση του ζυγωτή (Kristiansen and Skaloud. 2016).

1.2.3 Ροδόφυτα

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα κόκκινα φύκη, το χρώμα των οποίων δικαιολογείται λόγω της παρουσίας της χρωστικής φυκοβιλίνης. Τα κύτταρα τους περιέχουν διπλό κυτταρικό τοίχωμα (Fritsch, 1977), στο οποίο η εξωτερική στοιβάδα περιέχει τους πολυσακχαρίτες αγαρόζη και

αγαροπηκτίνη, ενώ το εσωτερικό αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη (Yoon et al., 2017). Οι οργανισμοί αυτής της κατηγορίας περιέχουν τις φωτοσυνθετικές χρωστικές χλωροφύλλη α και β, αλλά και β καροτίνη. Λόγω του πλούσιου περιεχομένου τους σε ωφέλιμα συστατικά για την ανθρώπινη διατροφή, όπως απαραίτητα αμινοξέα, ωμέγα-3 λιπαρά και βασικά μέταλλα, τα ροδόφυτα έχουν κερδίσει σημαντικό ενδιαφέρον στην αγορά των τροφίμων (Cotas et al., 2020). Η συγκεκριμένη κατηγορία μικροφυκών έχει αναφερθεί πως αναπαράγεται σεξουαλικά.

1.2.4 Φαιόφυτα

Τα φαιόφυτα, ή αλλιώς γνωστά ως καφέ φύκη, εντοπίζονται κυρίως σε παράκτια περιβάλλοντα, σχηματίζοντας συχνά πυκνά στρώματα (McCaughey and Wehr, 2007). Τα φαιόφυτα διαθέτουν ένα κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και έχει παρατηρηθεί ότι αναπαράγονται με μέσα κατακερματισμού και σεξουαλικής αναπαραγωγής. Ωστόσο, αυτό μπορεί να ανασταλεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι εποχιακές αλλαγές, το pH, η ένταση του φωτός και η θερμοκρασία (Mathieson et al., 1981).

1.2.5 Πυρόφυτα

Τα μικροφύκη αυτά είναι γνωστά ως φύκη της φωτιάς, λόγω του χρυσοκαφέ χρώματος τους. Ορισμένα είδη είναι ετερότροφα, ωστόσο, τα περισσότερα είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αφού περιέχουν χλωροφύλλες α και β και β-καροτίνη (Hackett et al., 2004). Λόγω του μοναδικού τους μοτίβου μίτωσης, του DNA τους και του αναπαραγωγικού τους συστήματος διαφέρουν σημαντικά τόσο από τα ευκαρυωτικά όσο και από τα προκαρυωτικά κύτταρα.

1.2.6 Ξανθόφυτα

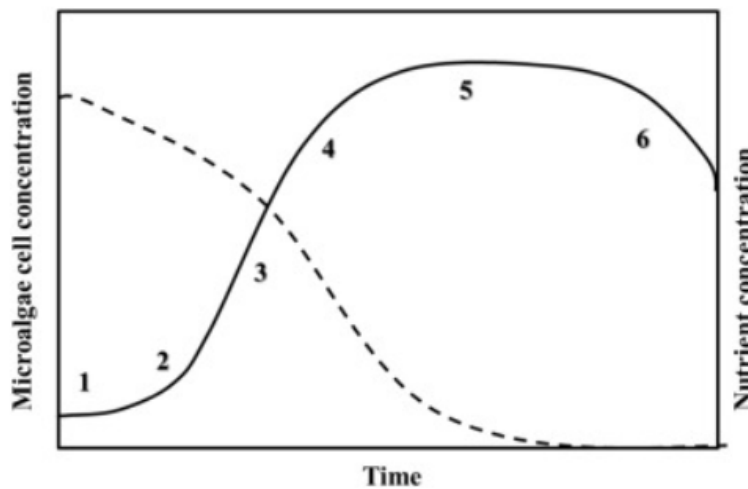
Τα φύκη αυτά έχουν κιτρινοπράσινο χρώμα και βρίσκονται συχνά σε περιβάλλοντα γλυκού νερού. Είναι μονοκύτταροι ή συνεννοκυτταρικοί οργανισμοί και έχουν μήκος μερικά χιλιοστά. Όπως τα περισσότερα μικροφύκη, περιέχουν χλωροφύλλες α και β-καροτίνη, σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αναπαράγονται συχνότερα ασεξουαλικά αλλά σε τρία γένη έχει παρατηρηθεί και σεξουαλική αναπαραγωγή (Kumar and Singh, 1979, Maistro et al., 2016).

1.2.7 Χλωρόφυτα

Τα μικροφύκη της κατηγορίας αυτής είναι γνωστά ως πράσινα φύκη και μπορούν να βρεθούν σε όλο τον κόσμο σε χερσαίο περιβάλλον αλλά και σε γλυκό και θαλασσινό νερό. Τα μέλη αυτής της κατηγορίας είναι μονοκύτταροι και πολυκύτταροι οργανισμοί που διαθέτουν χλωροφύλλες α και β εντός ενός μόνο χλωροπλάστη. Λόγω της ποικιλομορφίας αυτής της κατηγορίας, η αναπαραγωγή μπορεί να συμβεί τόσο σεξουαλικά όσο και ασεξουαλικά. Τα μικροφύκη *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* και *Haematococcus pluvialis* ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και χρησιμοποιούνται για εμπορική παραγωγή, ενώ τα μικροφύκη *Parietochloris incisa* και *Botryococcus braunii* προσφέρονται για παραγωγή λιπαρών και υδατανθράκων, αντίστοιχα. Ειδικότερα, το μικροφύκος του γλυκού νερού *Chlorella vulgaris*, είναι μονοκύτταρο και παράγεται ασεξουαλικά, παράγοντας τέσσερα θυγατρικά κύτταρα που απελευθερώνονται από το μητρικό κύτταρο με ρήξη του. Το κυτταρικό τοίχωμα του μικροφύκου αυτού γίνεται πιο πολύπλοκο και πιο σκληρό όσο αυτό ωριμάζει, λόγω της γλυκοζαμίνης, η οποία παρέχει ακαμψία (Martinez F. et al., 1991, Safi C. et al., 2014).

1.3 Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης μικροφυκών

Όπως οι μικροοργανισμοί, έτσι και τα μικροφύκη έχουν γενικά έξι φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης: τη λανθάνουσα φάση, την εκθετική φάση ανάπτυξης, την γραμμική φάση ανάπτυξης τη φάση μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης, τη στατική φάση και την φάση θανάτου. Αναλύοντας τις φάσεις ανάπτυξης, και ξεκινώντας από τη λανθάνουσα φάση (lag phase), η ανάπτυξη καθυστερεί κυρίως λόγω της περιόδου προσαρμογής που απαιτείται. Η βελτιστοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης απαιτεί την ελαχιστοποίηση αυτής της φάσης. Της λανθάνουσας φάσης έπεται η φάση εκθετικής ανάπτυξης (exponential phase), όπου τα κύτταρα αναπτύσσονται και αυξάνονται σε αριθμό ως εκθετική συνάρτηση του χρόνου. Σε αυτή την φάση, η ένταση του φωτός και τα θρεπτικά συστατικά δεν περιορίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Στην συνέχεια, ακολουθεί η φάση γραμμικής ανάπτυξης (linear phase), όπου ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης μειώνεται, καθώς η ένταση του φωτός είναι περιοριστικός παράγοντας. Στην φάση μειούμενου ρυθμού ανάπτυξης (declining growth phase), παρατηρείται μείωση του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης, λόγω περιοριστικών παραγόντων, όπως τα θρεπτικά συστατικά, το CO_2 κ.α. Στην συνέχεια, ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων μηδενίζεται, στην στατική φάση ανάπτυξης (stationary phase), καθώς τα θρεπτικά συστατικά του μέσου εξαντλούνται. Τελικά, η συγκέντρωση των κυττάρων μειώνεται ραγδαία στην φάση θανάτου (death phase), λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, υπερθέρμανσης, διαταραχής του pH ή μόλυνσης (Lee E. et al, 2015).



Διάγραμμα 1. Φάσεις ανάπτυξης κυττάρων μικροφυκών (συνεχής γραμμή) και συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών (διακεκομμένη γραμμή): (1) λανθάνουσα φάση, (2) φάση εκθετικής ανάπτυξης, (3) φάση γραμμικής ανάπτυξης, (4) φάση μειούμενου ρυθμού ανάπτυξης, (5) στατική φάση ανάπτυξης και (6) φάση θανάτου (Lee E. et al, 2015)

1.4 Καλλιέργεια μικροφυκών

1.4.1 Μέθοδοι ανάπτυξης καλλιέργειας μικροφυκών

1.4.1.1 Αυτότροφη καλλιέργεια

Η αυτότροφη καλλιέργεια θεωρείται το πιο κοινό σύστημα ανάπτυξης για μικροφύκη, και γενικά, σε αυτή την περίπτωση τα μικροφύκη χρησιμοποιούν, ως πηγή ενέργειας ανόργανες ενώσεις όπως

το CO_2 και το $NaHCO_3$, και απορροφούν φωτεινή ενέργεια. Η φωτεινή ενέργεια μπορεί να προσφέρεται είτε από τον ήλιο είτε από τεχνητό φως, όπως φακούς LED, για την βελτίωση παραγωγής συγκεκριμένων μορίων. Τα αυτότροφα συστήματα καλλιέργειας θεωρούνται τεχνικά και εμπορικά κλιμακώμενα, ειδικά σε εξωτερικό περιβάλλον είτε για τη βελτίωση της παραγωγής λιπαρών (χρησιμοποιώντας 2% CO_2 στον αέρα), είτε για την ανακύκλωση βιομηχανικού CO_2 (Zuccaro G. et al, 2020).

1.4.1.2 Ετερότροφη καλλιέργεια

Στην περίπτωση της ετερότροφης καλλιέργειας, τα μικροφύκη ως πηγή ενέργειας και ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούν οργανικά υποστρώματα. Ο συγκεκριμένος τύπος καλλιέργειας δίνει λύση στο πρόβλημα της απουσίας φωτός καθώς ορισμένα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν και υπό συνθήκες σκότους. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μορφής καλλιέργειας είναι η δυνατότητα υψηλού ελέγχου της ανάπτυξης και η υψηλή παραγωγικότητα, ενώ τα οργανικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται (γλυκόζη, γλυκερόλη, οξικό άλας) είναι φθηνά, καθώς συνήθως προέρχονται από πρώτες ύλες χαμηλού κόστους ή από λύματα. Ένας περιορισμένος αριθμός στελεχών μικροφυκών, όπως η *C. vulgaris*, η *C. protothecoides*, το *Cryptocodium cohnii* και το *Schizochytrium limacinum*, μπορούν να αναπτυχθούν υπό αυτές τις συνθήκες. Παρόλ' αυτά, η παρουσία οργανικών υποστρωμάτων και νερού αποτελούν πιθανή πηγή μικροβιακής μόλυνσης των μέσων καλλιέργειας και οι συνθήκες σκότους μπορεί να αναστείλουν την παραγωγή χρωστικών και δευτερογενών μεταβολιτών (Zuccaro G. et al, 2020).

1.4.1.3 Μιζότροφη καλλιέργεια

Στην μιζότροφη καλλιέργεια, για παραγωγή ενέργειας τα μικροφύκη χρησιμοποιούν την φωτοσύνθεση, αλλά είναι απαραίτητες τόσο οργανικές όσο και ανόργανες ενώσεις. Σε αυτό το πλαίσιο, ως πηγή άνθρακα τα μικροφύκη μπορούν να προσλαμβάνουν τόσο εξωγενείς οργανικές ενώσεις, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, γλυκερόλη, ορό γάλακτος, φλούδες φρούτων και οξικό νάτριο, όσο και CO_2 . Η ηλιακή ενέργεια και ο ανόργανος άνθρακας χρησιμοποιούνται κατά την φωτοσύνθεση, ενώ ο οργανικός άνθρακας χρησιμοποιείται κατά την αναπνοή. Αυτή η μορφή καλλιέργειας, συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των δύο προηγούμενων και στελέχη στα οποία θα μπορούσε να εφαρμοστεί είναι η *Spirulina platensis*, η *Chlamydomonas reinhardtii*, η *Chlorella sorokiniana*, η *Scenedesmus obliquus* και η *C. vulgaris*. Με την μιζότροφη καλλιέργεια, οι πολύτιμες χρωστικές και τα καροτενοειδή διατηρούνται υπό συνθήκες φωτισμού, αλλά λόγω απωλειών κατά τη φωτοσύνθεση η απόδοση είναι μειωμένη (Zuccaro G. et al, 2020).

Πίνακας 1. Οι διαφορές μεταξύ των μεθόδων ανάπτυξης καλλιέργειας μικροφυκών (Zuccaro G. et al, 2020)

Μέθοδος καλλιέργειας	Πηγή C	Πηγή ενέργειας	Απαιτήση για φως	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αυτότροφη	CO ₂	Φως	Υποχρεωτική	<ul style="list-style-type: none"> Χαμηλό κόστος Υψηλή παραγωγή χρωστικών 	<ul style="list-style-type: none"> Χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης Χαμηλή παραγωγικότητα βιομάζας
Ετερότροφη	Πηγή οργανικού άνθρακα	Πηγή οργανικού άνθρακα	Δεν απαιτείται	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλός ρυθμός ανάπτυξης Υψηλή παραγωγή βιομάζας Δυνατότητα απομάκρυνσης οργανικού C, N και P από λύματα Εύκολη μετατροπή σε μονάδα μεγάλης κλίμακας 	<ul style="list-style-type: none"> Πιθανότητα επιμόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς Κόστος πηγής οργανικού άνθρακα
Μιξότροφη	CO ₂ και πηγή οργανικού άνθρακα	Φως και πηγή οργανικού άνθρακα	Δεν είναι υποχρεωτική	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλός ρυθμός ανάπτυξης Υψηλή πυκνότητα βιομάζας Επιμηκυμένη φάση εκθετικής ανάπτυξης Μείωση απώλειας βιομάζας από την αναπνοή Μείωση της φωτοανασταλτικής δράσης 	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλό κόστος Προβλήματα επιμόλυνσης

1.4.2 Συστήματα καλλιέργειας

Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν κυρίως σε συστήματα που διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, τα ανοιχτά και τα κλειστά. Τα ανοιχτά συστήματα εκμεταλλεύονται το ηλιακό φως και εκτίθενται στο περιβάλλον, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα αυτών των συστημάτων καθώς αξιοποιούν φυσικές πηγές για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Τα κλειστά συστήματα ή φωτοβιοαντιδραστήρες (Photobioreactors - PBRs) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε σωληνωτά, επίπεδης πλάκας, στήλης και μεμβρανών.

1.4.2.1 Ανοιχτού τύπου

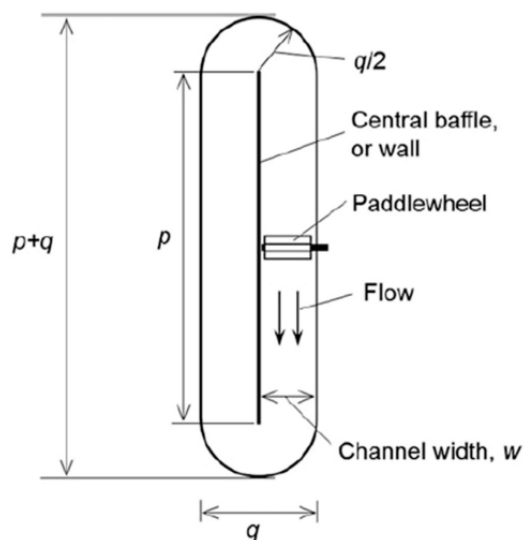
Τα συστήματα ανοιχτού τύπου μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε μη αναδεδυόμενα, αναδεδυόμενα με ροή και αναδεδυόμενα με κουπιά, ανάλογα με την ανάδευση και την καλλιέργεια. Συγκρινόμενα με τα συστήματα κλειστού τύπου, τα ανοιχτού τύπου απαιτούν χαμηλή αρχική επένδυση, και γενικά κατασκευάζονται με τσιμέντο ή συμπιεσμένο χώμα, σε διάφορα σχήματα, ώστε να πληρούν βασικές προϋποθέσεις, όπως η επαρκής πρόσληψη ηλιακού φωτός, η βέλτιστη υδροδυναμική δύναμη και η ύπαρξη ενός καναλιού κλειστού βρόγχου που θα εξασφαλίζει ομοιόμορφα κύτταρα. Δεν απαιτούν καλλιεργήσιμη γη, αλλά απαιτούν μεγάλη ποσότητα νερού, το οποίο αποτελεί μειονέκτημα. Ο σχεδιασμός αυτών των συστημάτων συνδέεται με πολλούς περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες αλλά και με διεργασίες, οι οποίες επηρεάζουν την παραγωγή βιομάζας. Μια επιτυχής καλλιέργεια βασίζεται στην σωστή εκτίμηση πρόσληψης φωτός και θερμοκρασίας του νερού αλλά και στην αναγνώριση και επισήμανση της μη ελεγχόμενης αλλαγής της ιονικής σύνθεσης της καλλιέργειας, η οποία μπορεί να αλλάζει λόγω εξάτμισης και λόγω της μεταβολής των περιβαλλοντικών συνθηκών. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ότι η παραγωγικότητα της βιομάζας επηρεάζεται επίσης από την ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας που συνυπάρχει με την καλλιέργεια των μικροφυκών, και η οποία περιλαμβάνει μύκητες, βακτήρια, αμοιβάδες και έντομα. Βέβαια, πρέπει να τονιστεί ότι η αλληλεπίδραση των διάφορων μικροβιακών κοινοτήτων στα συστήματα ανοιχτού τύπου, έχει αμοιβαία οφέλη για τους πληθυσμούς, καθώς για παράδειγμα από την συμβίωση βακτηρίων και μικροφυκών ευνοείται η παραγωγή εξωκυττάρων προϊόντων. Παγκοσμίως, παραπάνω από το 80% βιομάζας μικροφυκών παράγεται σε συστήματα ανοιχτού τύπου, κυρίως λόγω του χαμηλού αρχικού κόστους. Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται μια κλασική διάταξη ανοιχτού συστήματος με ανάδευση με ροή, όπου η επιφάνεια A και ο ενεργός όγκος V_L μπορούν να εκτιμηθούν από τις παρακάτω σχέσεις (Zuccaro G. et al, 2020).

$$A = \frac{\pi * q^2}{4} + p * q \quad (1)$$

$$V_L = A * h \quad (2)$$

όπου q το πλάτος της λίμνης
 p το μήκος της λίμνης
 h το βάθος του μέσου καλλιέργειας

Μικρότερο βάθος αυξάνει την αναλογία επιφάνειας – όγκου, γεγονός που ευνοεί την διείσδυση του φωτός, αλλά σε μια μεγάλη λίμνη, έκτασης έως και 10000 m², το βάθος κυμαίνεται μεταξύ 20 – 30 cm. Μια ακόμα παράμετρος που μπορεί να αυξήσει την αποδοτικότητα των ανοιχτών συστημάτων με ανάδευση με ροή, είναι η δημιουργία δινών, με χρήση του αριθμού Re , με προσοχή όμως να μην καταστρέφονται τα κύτταρα αλλά απλά να διατηρούνται σε αιώρηση, ώστε να αποφεύγεται η θερμική διαστρωμάτωση και να εξασφαλίζεται η απελευθέρωση του οξυγόνου που δημιουργείται από τη φωτοσύνθεση.



Εικόνα 1. Κάτοψη ενός τυπικού συστήματος ανοιχτού τύπου με ανάδευση με ροή

1.4.2.2 Κλειστού τύπου – Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs)

Η επιλογή συστημάτων κλειστού τύπου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της παραγωγικότητας της βιομάζας των μικροφυκών και των τελικών προϊόντων. Ωστόσο, αυτός ο τύπος καλλιέργειας απαιτεί επιπρόσθετα κόστη για φωτισμό, διοξείδιο του άνθρακα και τροφοδοσία της καλλιέργειας αλλά είναι ευκολότερος στον έλεγχο συγκρινόμενος με τα συστήματα ανοιχτού τύπου και επιτρέπει την ελαχιστοποίηση προβλημάτων σχετικών με την επιμόλυνση της καλλιέργειας. Παρολ' αυτά, η καλλιέργεια σε φωτοβιοαντιδραστήρες έχει πολλούς περιορισμούς, όσον αφορά στον περιοριστικό παράγοντα, ο οποίος σε αυτή την περίπτωση είναι το φως, και το σχηματισμό βιοφίλμ, που οδηγεί σε συσσώρευση οξυγόνου στην καλλιέργεια, γεγονός που έχει τοξικές επιπτώσεις στην φωτοσυνθετική ανάπτυξη. Τα παραπάνω προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν με σωστό σχεδιασμό και διαφορετικούς τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων, οι οποίοι όμως συχνά είναι πιο ακριβοί και πιο περίπλοκοι. Συνολικά, τα βασικά κριτήρια σχεδιασμού ενός φωτοβιοαντιδραστήρα είναι η ανάδευση, η μεταφορά μάζας, τα υλικά κατασκευής, η θερμοκρασία και η διείσδυση του φωτός στο μέσο καλλιέργειας, που όπως αναφέρθηκε και πριν είναι ο περιοριστικός παράγοντας αυτού του συστήματος.

Μια μορφή φωτοαντιδραστήρων είναι αυτή της στήλης με φυσαλίδες και αέρα. Αυτός ο αντιδραστήρας είναι μια απλή κυλινδρική συσκευή, ακτίνας όχι μεγαλύτερης από 0.2 m, ώστε να αποφευχθούν προβλήματα φωτισμού στο κέντρο του αντιδραστήρα, ενώ έχει ύψος μέχρι και 4 m για δομικούς λόγους. Υπάρχουν, επίσης, φωτοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας, κυβοειδούς σχήματος, οι οποίοι είναι κατασκευασμένοι από γυαλί ή άλλα διαφανή υλικά με υψηλή αναλογία επιφάνειας – όγκου και φωτοαντιδραστήρες σωληνοειδούς σχήματος, κατασκευασμένοι είτε από γυαλί είτε από πλαστικό, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε εξωτερικούς χώρους μαζικής καλλιέργειας και προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η δέσμευση ηλιακού φωτός μπορούν να προσαρμοστούν σε διάφορες κλίσεις, οριζόντια, κάθετη ή κεκλιμένη. Τέλος, υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες με μεμβράνες, που προσφέρουν μια εναλλακτική στην συμβατική

τεχνολογία των αντιδραστήρων αυτών, αλλά μειονεκτούν λόγω του σύντομου χρόνου παραμονής της καλλιέργειας εντός του αντιδραστήρα (Zuccaro G. et al, 2020).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη

1.5.1 Θερμοκρασία

Υπάρχει άμεση συσχέτιση των φυσικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών της ανάπτυξης των μικροφυκών με τη θερμοκρασία. Κάθε είδος μικροφύκους έχει το δικό του ιδανικό θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης, οπότε τα μικροφύκη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με αυτό σε ψυχρόφιλα (< 15 °C), μεσόφιλα (< 50 °C), και θερμόφιλα (> 50 °C). Η υψηλότερη θερμοκρασία για ευκαριωτικό μικροφύκος είναι οι 62 °C, ενώ λόγω αποσταθεροποίησης της χλωροφύλλης, δεν έχουν εντοπιστεί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που να μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες > 75 °C. Η θερμοκρασία επηρεάζει επίσης και την πρόσληψη CO₂. Συγκεκριμένα, υψηλότερες θερμοκρασίες βελτιώνουν την απορρόφηση CO₂ αλλά ταυτόχρονα αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την αναπνοή και τον μεταβολισμό του κυττάρου, αλλά και για τις φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες, καθώς διαταράσσεται το ισοζύγιο ενέργειας του κυττάρου. Οι υψηλές θερμοκρασίες επιπλέον μειώνουν το μέγεθος του κυττάρου και την ανάπτυξη της βιομάζας, ειδικά σε καλλιέργειες εξωτερικού χώρου. Τέλος, οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έντονη επεξεργασία για να προκληθεί η παραγωγή πολύτιμων μεταβολιτών (Zuccaro G. et al, 2020).

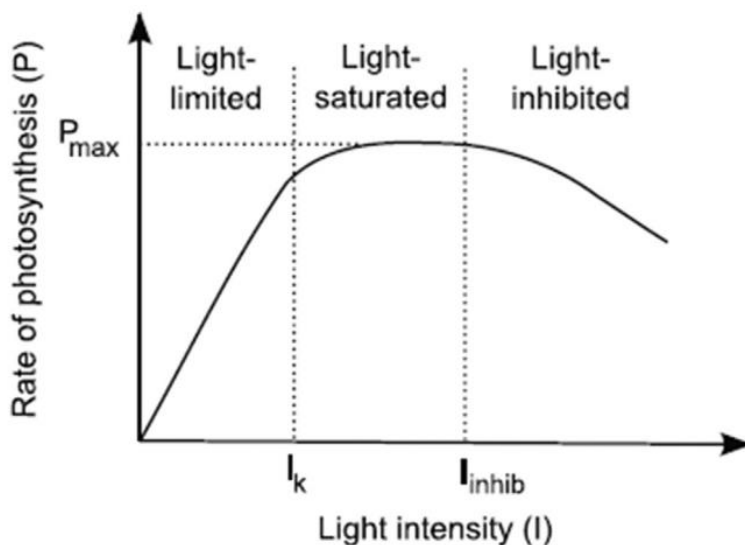
1.5.2 pH

Ο μεταβολισμός των μικροφυκών σχετίζεται άμεσα με το pH καθώς ρυθμίζει την πρόσληψη ιόντων, την ενζυμική δραστηριότητα, τη διαθεσιμότητα φωσφόρου και ανόργανου άνθρακα και την τοξικότητα της αμμωνίας. Τα περισσότερα είδη μικροφυκών είναι ευαίσθητα στην αλλαγή του pH, γι' αυτό και είναι απαραίτητη η μέτρηση και η ρύθμιση του, η οποία γίνεται με χρήση CO₂. Στο θαλασσινό νερό το pH κυμαίνεται μεταξύ 7.9 – 8.3 ενώ στο γλυκό νερό μεταξύ 6 – 8 (Zuccaro G. et al, 2020).

1.5.3 Φως

Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της ανάπτυξης των μικροφυκών, της έντασης του φωτός και της διάρκειας της καλλιέργειας, καθώς η μεταβολή των τελευταίων μπορεί να επηρεάσει την φωτοσύνθεση και το βιοχημικό περιεχόμενο, όπως επίσης και την απόδοση της βιομάζας. Η σχέση μεταξύ έντασης του φωτός (I) και ρυθμού φωτοσύνθεσης (P) φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα. Όπως φαίνεται, εάν $I < I_k$ ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης είναι ανάλογα μικρός με την ένταση του φωτός και περιορίζεται από τον ρυθμό πρόσληψης φωτονίων, εάν $I_k < I < I_{inhib}$ ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης είναι ο μέγιστος και συνήθως είναι ανεξάρτητος από την ένταση του φωτός, ενώ σε αυτό το εύρος έντασης φωτός ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης περιορίζεται από τον ρυθμό των αντιδράσεων που ακολουθούν την πρόσληψη φωτονίων. Τέλος, εάν $I > I_{inhib}$ ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης αρχίζει να μειώνεται με την αύξηση της έντασης του φωτός, καθώς μετά από ένα ορισμένο επίπεδο έντασης καταστρέφονται οι υποδοχείς φωτός, όπως οι πρωτεΐνες κλειδιά στους χλωροπλάστες. Αυτή η φάση είναι γνωστή ως φωτοαναστολή. Το βέλτιστο επίπεδο έντασης

φωτός για τα περισσότερα είδη μικροφυκών είναι μεταξύ 200 – 400 (mmol / m² s) (Zuccaro G. et al, 2020).



Εικόνα 2. Σχέση μεταξύ έντασης φωτός (I) και ρυθμού φωτοσύνθεσης (P)

1.5.4 Θρεπτικά συστατικά (C, P, N)

Οι καλλιέργειες μικροφυκών απαιτούν απαραίτητα μακροθρεπτικά συστατικά, βιταμίνες και ίχνη μετάλλων σε επαρκείς ποσότητες και σε βιοδιαθέσιμες μορφές. Παρότι από την βιβλιογραφία η συνταγή για την παρασκευή του μέσου καλλιέργειας συχνά θεωρείται σταθερή και ακολουθεί την αναλογία C:N:P 106:16:1, η εμπειρία στην καλλιέργεια μικροφυκών έχει δείξει ότι η αναλογία μπορεί να είναι ευέλικτη και να προσαρμοστεί στις μεταβολικές ανάγκες του μικροφύκου.

1.5.4.1 Άνθρακας

Ο άνθρακας είναι το βασικό συστατικό της βιομάζας των μικροφυκών, φτάνοντας μέχρι και το 65% του ξηρού τους βάρους. Σε μερικά μόνο είδη και ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας δεν ξεπερνά το 18%, γενικά, όμως, η πλειοψηφία των μικροφυκών περιέχει περίπου 50%, και η αύξηση του ποσοστού αυτού είναι αυστηρά συνδεδεμένη με τον περιορισμό από τα άλλα συστατικά, όπως το άζωτο και ο φώσφορος. Ο άνθρακας λαμβάνεται κυρίως στην ανόργανη μορφή του ως CO₂ και ακολουθεί την παρακάτω εξίσωση, ανάλογα με το pH του διαλύματος. Όταν το pH είναι χαμηλότερο από 6.5 η κυρίαρχη μορφή είναι το H₂CO₃, όταν παίρνει τιμές μεταξύ 6.5 – 10 η κυρίαρχη μορφή είναι το HCO₃⁻, ενώ σε τιμές pH μεγαλύτερες από 10 η μορφή CO₃²⁻ γίνεται η κυρίαρχη (Zuccaro G. et al, 2020).



1.5.4.2 Άζωτο

Το άζωτο είναι το δεύτερο πιο άφθονο στοιχείο στην βιομάζα των μικροφυκών, με συγκέντρωση συνήθως μεταξύ 1 – 14 % του ξηρού βάρους. Το άζωτο είναι απαραίτητο συστατικό που βρίσκεται στο DNA, το RNA, τις πρωτεΐνες και τις χρωστικές (χλωροφύλλες και φυκοκυανίνη). Η βασική

οδός μεταβολισμού του αζώτου είναι η χρήση του από το ένζυμο συνθετάση γλουταμίνης, καθώς το γλουταμινικό αντιδρά με την αμμωνία προς παραγωγή του αμινοξέος γλουταμίνη. Το άζωτο προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη σε ανόργανη μορφή NO_3^- , NO_2^- , NO και NH_4^+ αλλά και σε οργανική, ως αμινοξέα ή ουρία (Zuccaro G. et al, 2020).

1.5.4.3 Φώσφορος

Ο φώσφορος είναι ένα ακόμα θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των μικροφυκών και η περιεκτικότητά του στη βιομάζα είναι 0.05 – 3.3 %. Οργανικά μόρια, όπως το RNA, το DNA, η μεμβράνη φωσφολιπιδίων και το ATP περιέχουν φώσφορο, ο οποίος προέρχεται κυρίως από φωσφορικό νάτριο, φωσφορικό κάλιο και φωσφορικό αμμώνιο. Ο ρυθμός πρόσληψης του φωσφόρου επηρεάζεται από το διαθέσιμο φως, το pH, τη θερμοκρασία και τα διαθέσιμα ιόντα (K^+ , Na^+ , Mg^{2+}). Τα μικροφύκη μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικά αποθέματα φωσφόρου, ως κόκκους πολυφωσφορικού, και τα χρησιμοποιούν ως πηγή φωσφόρου. Λόγω αυτής της ιδιότητας τους να απορροφούν φώσφορο, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση φωσφόρου από τα λύματα (Zuccaro G. et al, 2020).

1.5.4.4 Άλλα θρεπτικά συστατικά

Απαραίτητα για το μέσο καλλιέργειας είναι και μικροθρεπτικά συστατικά όπως το μαγνήσιο σε ένα εύρος 0.35 – 0.7 %, το οποίο υπάρχει κυρίως σε υδατικά διαλύματα ως Mg^{2+} και παρέχεται ως $MgSO_4$ ή $MgCl_2$. Το θείο επίσης είναι σημαντικό μικροθρεπτικό συστατικό και η περιεκτικότητά του στην βιομάζα είναι 0.15 – 1.6 %, σε μορφή αμινοξέων, βιταμινών και δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν θείο. Το θείο προσλαμβάνεται κυρίως με την μορφή θειικού SO_4^{2-} . Ένα ακόμα μικροθρεπτικό συστατικό είναι το ασβέστιο, το οποίο περιέχεται σε ένα εύρος 0.1 – 1.4 %, αλλά μπορεί και να φτάσει μέχρι 8%. Συχνά προστίθεται με την μορφή $CaCl_2$ και μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική διαίρεση και την γενικότερη μορφογένεση. Τέλος, ο σίδηρος εμπλέκεται σε θεμελιώδεις ενζυμικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός του οξυγόνου, η μεταφορά ηλεκτρονίων, η πρόσληψη του αζώτου και η σύνθεση χλωροφυλλών και συνήθως παρέχεται με την μορφή χημικών συμπλόκων, ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του (Zuccaro G. et al, 2020).

1.6 Εφαρμογές και οφέλη των βιοδραστικών συστατικών των μικροφυκών

Τα μικροφύκη παράγουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Η δυνατότητα των μικροφυκών να παράγουν αντιοξειδωτικές ουσίες, καροτενοειδή, φυσικές χρωστικές, στερόλες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ενζυμικά πολυμερή, τα καθιστά πολύ χρήσιμα για διάφορα βιομηχανικά προϊόντα. Αρχικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής στην ανθρώπινη διατροφή αλλά και ως ζωοτροφές, ενώ ευρεία είναι η χρήση τους και στον τομέα των καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων, και συγκεκριμένα στην παραγωγή αντιμικροβιακών, αντιβακτηριακών και αντικαρκινικών φαρμάκων. Ακόμα, μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή βιολιπασμάτων, ενώ αξιοσημείωτη είναι και η χρήση τους στην περιβαλλοντική βιοτεχνολογία, καθώς χρησιμοποιούνται στην απομάκρυνση των οργανικών επιμολυντών, την επεξεργασία λυμάτων και τον περιορισμό των εκπομπών CO_2 (Spolaore P., 2006, Suganva T., 2016, Privadarshani I., 2012).

1.7 Σύνοψη

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα μικροφύκη αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πηγή βιοδραστικών συστατικών, όπως λιπαρών και χρωστικών, τα οποία βρίσκουν ποικιλία εφαρμογών στην βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ, στην παραγωγή ζωοτροφών αλλά και σε άλλες βιομηχανίες. Παράλληλα όμως αποτελούν και μια σπουδαία πηγή πρωτεϊνών, η οποία ούσα φυτική πηγή, μπορεί μελλοντικά να δώσει μια πιο βιώσιμη και οικολογική εναλλακτική έναντι των ζωικών πρωτεϊνών, τόσο στον τομέα των ζωοτροφών όσο και στον τομέα της ανθρώπινης διατροφής. Ένα από τα μικροφύκη με αξιοσημείωτο πρωτεϊνικό περιεχόμενο είναι το μικροφύκος *C. ryrenoidosa*, το οποίο επιλέχθηκε να μελετηθεί στην παρούσα διπλωματική, τόσο λόγω του περιεχομένου του όσο και του περιθωρίου περαιτέρω έρευνας που υπάρχει γύρω από αυτό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: *Chlorella* *pyrenoidosa*

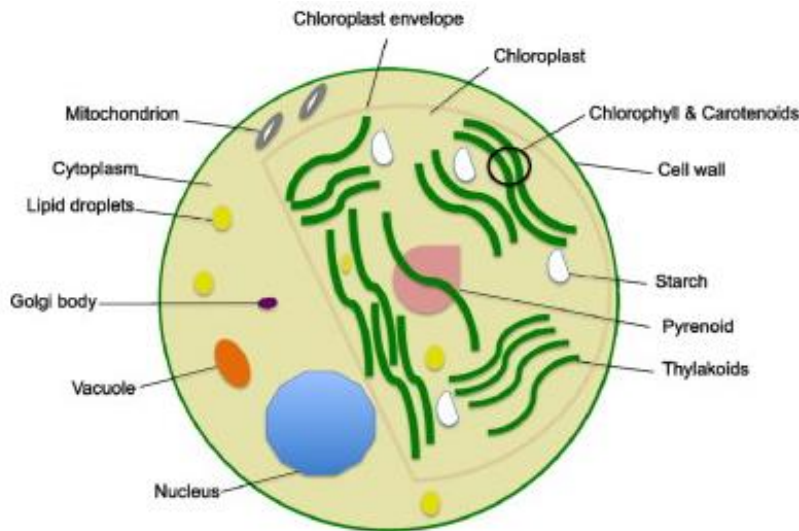
2.1 Εισαγωγή

Η *C. pyrenoidosa* είναι ένα είδος φύκους του γλυκού νερού που χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής, εφόσον πρόκειται για ένα βρώσιμο και ασφαλές μικροφύκος. Κάθε χρόνο, στις ΗΠΑ, την Ιαπωνία, την Ταϊβάν και την Ινδονησία παράγονται 2500 t ξηρής *Chlorella*, καθώς θεωρείται μια καλή πηγή θρεπτικών συστατικών και ένα τρόφιμο με θετική επίδραση στην υγεία. Διάφορες κλινικές και ζωικές μελέτες έχουν δείξει ότι η *C. pyrenoidosa* είναι μια ασφαλής πηγή πρωτεϊνών για κατανάλωση, ενώ συμπληρώματα διατροφής με *Chlorella* μπορούν να μειώσουν την υψηλή αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα χοληστερόλης και γλυκόζης στο αίμα, να επιταχύνουν την επούλωση πληγών και να ενισχύσουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Ταυτόχρονα, καθώς οι πρωτεΐνες της *Chlorella* μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα των ζωικών πρωτεϊνών, η χρήση τους έχει θετική επίδραση για το περιβάλλον.

2.2 Δομή του κυττάρου του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa*

2.2.1 Μορφολογία του κυττάρου

Η *C. pyrenoidosa* ανήκει στην κατηγορία των μικροφυκών και έχει ένα σφαιρικό κύτταρο με διάμετρο 2 – 10 μm, ενώ διαθέτει πολλά δομικά χαρακτηριστικά, παρόμοια με αυτά των φυτών.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της δομής του κυττάρου του μικροφύκου *C. pyrenoidosa*

2.2.1.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Η ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος διατηρεί την ακεραιότητα του κυττάρου και το προστατεύει από εισβολείς και τις δριμύεις συνθήκες του περιβάλλοντος. Ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης το κυτταρικό τοίχωμα διαφοροποιείται. Στη φάση της πρώιμης ανάπτυξης στα αυτοσπόρια του, το κυτταρικό τοίχωμα είναι εύθραυστο, σχηματίζοντας ένα λεπτό μονοστρωματικό στρώμα, πάχους 2 nm και υψηλής ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος αυξάνεται σταδιακά φτάνοντας μέχρι και τα 17 – 21 nm μετά την

ωρίμανση, όποτε και σχηματίζεται ένα μικροινώδες στρώμα είτε γλυκοζαμίνης είτε του πολυμερούς γλυκόζης – μανόζης, το οποίο ευθύνεται για την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ το κυρίαρχο σάκχαρο που εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα είναι η ακετυλογλυκοζαμίνη, η οποία υπάρχει ως γλυκάνη που ομοιάζει με χιτίνη. Στο ώριμο στάδιο της ανάπτυξης, το πάχος και η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος δεν είναι σταθερά, καθώς μπορούν να μεταβληθούν ανάλογα με τις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και περιβάλλοντος (Safi C.et al, 2014, Gerken H.G. et al, 2012).

2.2.1.2 Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη περιβάλλει το κύτταρο και λειτουργεί προστατευτικά αλλά ταυτόχρονα λειτουργεί και ως δίαυλος επικοινωνίας με το εξωκυττάριο περιβάλλον, καθώς επιτρέπει τη μεταφορά ορισμένων μόνο ουσιών. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και μεταφορικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, τα φωσφολιπίδια διαθέτουν υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά και διατάσσονται σε μορφή λιπιδικής διπλοστιβάδας, και ανάμεσα τους παρεμβάλλονται πρωτεΐνες και η χοληστερόλη, η οποία ευθύνεται για τη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης, συνθέτοντας με αυτόν τον τρόπο ένα ρευστό μωσαϊκό. (Maxfield F.R., 2002).

2.2.1.3 Κυτόπλασμα

Είναι μια ουσία με μορφή γέλης, η οποία αποτελείται από νερό, διαλυτές πρωτεΐνες και μέταλλα και περιορίζεται στο φράγμα της κυτταρικής μεμβράνης. Μέσα στο κυτόπλασμα υπάρχουν όλα τα εσωτερικά όργανα της *C. Pyrenoidosa*, όπως τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας, τα κενοτόπια, ο χλωροπλάστης και το σύμπλεγμα Golgi (Kuchitsu K. et al, 1987, Solomon EP et al, 1999).

2.2.1.4 Μιτοχόνδριο

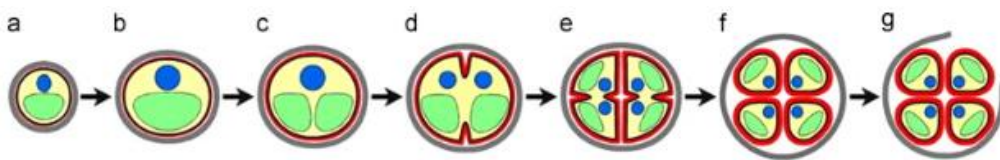
Κάθε μιτοχόνδριο διαθέτει γενετικό υλικό, το αναπνευστικό σύστημα και περιβάλλεται από μεμβράνη διπλής στοιβάδας. Το εξωτερικό μέρος της μεμβράνης περιβάλλει όλο το όργανο και αποτελείται από ίσο αριθμό πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων. Παρολ' αυτά, το εσωτερικό μέρος της μεμβράνης αποτελείται από τριπλάσιο αριθμό πρωτεϊνών σε σχέση με τον αριθμό των φωσφολιπιδίων και περιβάλλει τον εσωτερικό χώρο του μιτοχονδρίου, που ονομάζεται μήτρα, και περιέχει την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. (Safi C.et al, 2014)

2.2.1.5 Χλωροπλάστης

Η *C. pyrenoidosa* έχει έναν μόνο χλωροπλάστη με διπλή περιβάλλουσα μεμβράνη που αποτελείται από φωσφολιπίδια. Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή από μεταβολίτες και ιόντα και η εσωτερική έχει μια πιο συγκεκριμένη λειτουργία ως προς την μεταφορά των πρωτεϊνών. Σε δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης, εντός του χλωροπλάστη μπορούν να σχηματιστούν μόρια αμύλου, τα οποία αποτελούνται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη. Στον χλωροπλάστη επίσης υπάρχει ένα σύμπλεγμα συντηγμένων θυλακοειδών όπου συντίθεται η κυρίαρχη χρωστική, χλωροφύλλη, η οποία καλύπτει το χρώμα όλων των άλλων χρωστικών, όπως η λουτεΐνη. (Van der Hoek C.et al, 1995, Lee RE, 2008)

2.3 Αναπαραγωγή

Η *C. pyrenoidosa* ανήκει στην κατηγορία των χλωροφυκών και όπως αναφέρθηκε ορισμένα από τα μικροφύκη αυτής της κατηγορίας αναπαράγονται ασεξουαλικά. Ένα από αυτά είναι και η *C. pyrenoidosa*, η οποία αναπαράγεται με τον πιο συχνά απαντώμενο τρόπο ασεξουαλικής αναπαραγωγής στα μικροφύκη, την αυτοσπορίωση. Συγκεκριμένα, 4 θυγατρικά κύτταρα που διαθέτουν το δικό τους κυτταρικό τοίχωμα αναπτύσσονται εντός του μητρικού, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Αφού τα θυγατρικά κύτταρα ωριμάσουν πλήρως, το κυτταρικό τοίχωμα του μητρικού διαρρηγνύεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των νεοσχηματισθέντων κυττάρων, ενώ τα θραύσματα του μητρικού κυττάρου παραμένουν ως τροφή για τα θυγατρικά κύτταρα. Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα 24h, για ένα κύτταρο *C. pyrenoidosa* που αναπτύσσεται στις βέλτιστες συνθήκες. (Yamamoto M. et al 2004, Yamamoto M. et al, 2005)



Εικόνα 4. Αναπαράσταση των διάφορων φάσεων ανάπτυξης του κυττάρου *C. pyrenoidosa* (a) πρώτη φάση κυτταρικής ανάπτυξης, (b) προχωρημένη φάση κυτταρικής ανάπτυξης, (c) φάση διαίρεσης του χλωροπλάστη, (d) πρώτη φάση διαίρεσης του πρωτοπλάστη, (e) προχωρημένη φάση διαίρεσης του πρωτοπλάστη, (f) φάση ωρίμανσης των θυγατρικών κυττάρων και (g) φάση εκκόλαψης

2.4 Χρήσιμα συστατικά του μικροφύκου *C. pyrenoidosa*

2.4.1 Πρωτεΐνες

Το συνολικό ποσοστό πρωτεϊνών σε ένα ώριμο κύτταρο *C. pyrenoidosa* αποτελεί το 42 – 58 % του ξηρού βάρους της βιομάζας, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι πρωτεΐνες επιτελούν διάφορους βασικούς ρόλους, όπως η ανάπτυξη, η επιδιόρθωση και η συντήρηση του κυττάρου αλλά λειτουργούν επίσης και ως χημικοί αγγελιοφόροι, ρυθμιστές των κυτταρικών δραστηριοτήτων και ως άμυνα σε εξωτερικούς εισβολείς, και περίπου το 20% των συνολικών πρωτεϊνών βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα, παραπάνω από το 50% βρίσκεται εσωτερικά του κυττάρου, στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλάστων, και το 30% μεταναστεύει εντός και εκτός κυττάρου. Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών βρίσκεται μεταξύ 12 – 120 kDa, με την πλειοψηφία να βρίσκεται μεταξύ 39 – 75 kDa, μετά από ανάπτυξη σε αυτότροφες ή ετερότροφες συνθήκες, ενώ σημειώνεται ότι σε ανάπτυξη σε αυτότροφες συνθήκες παρατηρείται η υψηλότερη ανάπτυξη. Όσον αφορά την μετουσίωση των πρωτεϊνών της *C. pyrenoidosa*, σημειώνεται ότι αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η μέθοδος εκχύλισης, οι διαλύτες και η προεπεξεργασία των κυττάρων, αλλά βιβλιογραφικά αναφέρεται πως συμβαίνει στο εύρος 75 – 95 °C (Ghribi et al. 2015, Ibanoglu 2005).

2.4.1.1 Προφίλ των αμινοξέων

Η διατροφική αξία των πρωτεϊνών καθορίζεται από το προφίλ των αμινοξέων τους και όπως στην πλειοψηφία των μικροφυκών, έτσι και στην *C. pyrenoidosa*, το προφίλ των αμινοξέων είναι

αρκετά συγκρίσιμο ή και καλύτερο από το πρότυπο προφίλ που προτείνεται για την ανθρώπινη διατροφή από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), καθώς το κύτταρο της *C. pyrenoidosa* συνθέτει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως η λυσίνη, η μεθειονίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη και η φαινυλαλανίνη, σε σημαντικές συγκεντρώσεις, αλλά και μη απαραίτητα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 (Smith and Nielsen, 2010).

Πίνακας 2. Το προφίλ αμινοξέων της *C. pyrenoidosa* συγκρινόμενο με αυτό άλλων πηγών πρωτεϊνών εκφρασμένο σε g ανά 100 g πρωτεΐνης (Waghmare A. et al, 2016)

Αμινοξέα	Περιεκτικότητα πρωτεϊνών <i>C.pyrenoidosa</i> *	Περιεκτικότητα στο αυγό*	Περιεκτικότητα στην σόγια*	Προτεινόμενη πρόσληψη από FAO/WHO*
Ασπαρτικό οξύ	8.12 ± 0.16	11.00	1.30	Μη διαθέσιμη
Γλουταμικό οξύ	7.87 ± 0.23	12.60	19.00	Μη διαθέσιμη
Σερίνη	2.79 ± 0.03	6.90	5.80	Μη διαθέσιμη
Ιστιδίνη	1.64 ± 0.01	2.40	2.60	1.5
Γλυκίνη	9.73 ± 0.42	4.20	4.50	Μη διαθέσιμη
Θρεονίνη	3.45 ± 0.04	5.00	4.00	2.30
Αργινίνη	5.91 ± 0.07	6.20	7.40	Μη διαθέσιμη
Αλανίνη	5.08 ± 0.19	Δεν έχει ανιχνευτεί	5.00	Μη διαθέσιμη
Τυροσίνη	1.22 ± 0.01	4.20	3.20	3.80
Φαινυλαλανίνη	3.83 ± 0.11	5.80	5.00	3.80
Βαλίνη	5.17 ± 0.05	7.20	5.30	3.90
Μεθειονίνη	3.30 ± 0.02	3.20	1.30	2.20
Κυστεΐνη	2.82 ± 0.06	2.30	1.90	2.20
Ισολευκίνη	6.20 ± 0.14	6.60	5.30	3.00
Λευκίνη	3.44 ± 0.06	7.00	7.70	5.90
Λυσίνη	8.14 ± 0.37	5.30	6.40	4.50
Τρυπτοφάνη	1.22 ± 0.01	4.20	3.20	3.80

*Η περιεκτικότητα είναι εκφρασμένη σε (g/100 g πρωτεΐνης)

2.4.1.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου

Ανεξάρτητα από τη διεργασία εκχύλισης, οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν εξαιρετική γαλακτωματοποιητική ικανότητα, συγκρίσιμη ή, ακόμα, και καλύτερη από αυτή των εμπορικών συστατικών. Συγκεκριμένα, αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμένων πρωτεϊνών της *C. pyrenoidosa* σε pH=7 φτάνει μέχρι και τα 2.1 g ελαίου/ ml πρωτεϊνικού συμπυκνώματος. Η ικανότητα συγκράτησης ελαίου των πρωτεϊνών της *C. pyrenoidosa*, που αντανακλά την γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα, εξηγείται από την ύπαρξη μη πολικών πλευρικών αλυσίδων, οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες των λιπαρών και να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη απορρόφηση ελαίου. Παράλληλα, σημαντική είναι και ικανότητα συγκράτησης νερού των πρωτεϊνών της *C.*

pyrenoidosa, η οποία εξηγείται από την παρουσία πολικών αμινοξέων. Αυτή έχει προσδιοριστεί ως 3.1 g νερού/ ml πρωτεϊνικού συμπυκνώματος (Waghmare A. et al,2016).

2.4.1.3 Ικανότητα αφρισμού και σταθερότητα του αφρού

Οι πρωτεΐνες της *C. pyrenoidosa* παρουσιάζουν, επιπλέον, εξαιρετική ικανότητα αφρισμού. Συγκεκριμένα, η ικανότητα αφρισμού συνδέεται με εύκαμπτα μόρια πρωτεϊνών που μειώνουν την επιφανειακή τάση και διατηρούν τις φυσαλίδες αέρα σε αιώρηση, ενώ μειώνουν τον ρυθμό συγχώνευσης τους. Η ικανότητα αφρισμού ενός συμπυκνώματος πρωτεϊνών *C. pyrenoidosa* έχει υπολογιστεί ότι είναι 95%, ενώ η ικανότητα αφρισμού συμπυκνώματος πρωτεϊνών του φασολιού *Psophocarpus tetragonolobus* είναι 36% και αυτή του φασολιού *mucuna* είναι 58%. Παρολ' αυτά, η ικανότητα αφρισμού προϊόντων απομόνωσης σόγιας είναι 235%. Εξίσου σημαντική με την ικανότητα αφρισμού είναι και η σταθερότητα του αφρού, η οποία για ένα συμπύκνωμα πρωτεϊνών *C. pyrenoidosa* είναι 97% μετά από αποθήκευση για 180 min (Waghmare A. et al,2016).

2.4.2 Λιπαρά

Τα λιπαρά σε ξηρό βάρος βιομάζας μπορούν να φτάσουν μέχρι και 5 – 40 %, κατά την ανάπτυξη της *C. pyrenoidosa* σε βέλτιστες συνθήκες και αποτελούνται κυρίως από γλυκολιπίδια, κήρους, υδρογονάνθρακες, φωσφολιπίδια και μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τα συστατικά αυτά συντίθενται στον χλωροπλάστη, ενώ εντοπίζονται και στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά και στις μεμβράνες του χλωροπλάστη και των μιτοχονδρίων. Σε αντίθετες συνθήκες ανάπτυξης, το περιεχόμενο σε λιπίδια μπορεί να φτάσει και το 58% και αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια.

Το προφίλ των λιπαρών οξέων επίσης μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, όταν η ανάπτυξη γίνεται σε μιξοτροφικές συνθήκες μπορούν να συσσωρευτούν 60 – 68 % κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι κυρίως παλμιτικό οξύ ($C_{18}:1$), το στεατικό οξύ ($C_{18}:0$), το παλμιτελαϊκό ($C_{16}:1$) και το ελαϊκό οξύ ($C_{18}:1$), προφίλ το οποίο ευνοεί την χρήση τους για παραγωγή βιοντίζελ. Αντιθέτως, όταν η ανάπτυξη γίνεται σε ευνοϊκές συνθήκες, το προφίλ των λιπαρών οξέων δεν είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ αλλά είναι κατάλληλο για αξιοποίηση στην διατροφή καθώς είναι πλουσιότερο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινολεϊκό οξύ ($C_{18}:2$), το λινολενικό οξύ ($C_{18}:3$) και το εικοσιπενταενοϊκό οξύ ($C_{20}:5$) (Mata TM et al. 2010, Hu Q. et al, 2008, Zheng H. et al, 2011, Yeh KL. and Chang JS, 2011, Stephenson AL. et al, 2009, Chen W. et al, 2011)

2.4.3 Υδατάνθρακες

Το άμυλο είναι ο πολυσακχαρίτης που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο κύτταρο της *C. pyrenoidosa* και εντοπίζεται στον χλωροπλάστη. Αυτό μαζί με λοιπά σάκχαρα αποτελούν τα αποθέματα ενέργειας του κυττάρου. Στο κυτταρικό τοίχωμα εντοπίζεται κυτταρίνη, η οποία είναι ένας δομικός πολυσακχαρίτης με υψηλή αντοχή και λειτουργεί ως προστατευτικός ινώδης φραγμός, ενώ στο πρώτο εντοπίζονται επίσης ραμνόζη (45-54%), γαλακτόζη (14-26%), γλυκόζη (1-4%), ξυλόζη (7-19%), αραμπινόζη (2-9%) και μανόζη (2-7%). Επιπλέον, στο κύτταρο της *C. pyrenoidosa* υπάρχει και $\beta_{1\rightarrow3}$ γλυκάνη, η οποία είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλής σημασίας καθώς έχει πολλαπλά οφέλη για την υγεία (Takeda H., 1988, Takeda H., 1991, Takeda H. and Hirokawa T., 1984, Blumreisinger M. et al, 1983, Ogawa K. et al, 1999).

2.4.4 Χρωστικές

Η χρωστική που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στην *C. pyrenoidosa* είναι οι χλωροφύλλες, οι οποίες βρίσκονται στα θυλακοειδή. Στο κύτταρο της *C. pyrenoidosa*, υπάρχουν σημαντικές ποσότητες καροτενοειδών, τα οποία λειτουργούν ως δεσμευτές του ηλιακού φωτός. Αυτές οι χρωστικές έχουν πολλαπλές θεραπευτικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική ικανότητα, προστατευτική δράση έναντι του εκφυλισμού του αμφιβληστροειδούς, ρύθμιση της χοληστερόλης στο αίμα και ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Κατά την διάρκεια έντονων συνθηκών εκχύλισης ή κατά την αποικοδόμηση της χλωροφύλλης στο στάδιο της ανάπτυξης, μπορούν να σχηματιστούν φαιοφυτίνες, οι οποίες είναι χρωστικές βιοχημικά παρόμοιες με τις χλωροφύλλες και οι οποίες είναι λιπόφιλες, συνεπώς η εκχύλιση τους συσχετίζεται με την εκχύλιση των λιπαρών (Solomon EP. et al, 1999, Gouneia L. et al, 2005).

2.4.5 Μέταλλα

Το κύτταρο της *C. pyrenoidosa* περιέχει *Na, K, Ca, Mg, P* και *Fe*, ενώ σε ίχνη περιέχει επίσης *Cr, Cu, Zn, Mn* και *Se*. Τα μέταλλα είναι απαραίτητα για την ανθρώπινη διατροφή καθώς επιτελούν σημαντικούς λειτουργικούς ρόλους. Παραδείγματος χάριν, το K^+ συνδέεται με την εξισορρόπηση των ενδοκυττάρων υγρών, το μεταβολισμό των υδατανθράκων, τη σύνθεση πρωτεϊνών και τα νευρικά ερεθίσματα. Από την άλλη, το μαγνήσιο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της φυσιολογικής νευρικής δραστηριότητας και της συστολής των μυών, ενώ ο ψευδάργυρος είναι βασικό συστατικό των ενζύμων που συμμετέχουν σε μεταβολικές δραστηριότητες σύνθεσης υδατανθράκων, λιπαρών και πρωτεϊνών (Solomon EP. et al, 1999).

2.4.6 Βιταμίνες

Η *C. pyrenoidosa* διαθέτει ένα σημαντικό προφίλ βιταμινών. Συγκεκριμένα διαθέτει βιταμίνη Α, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα, βιταμίνη C, η οποία έχει αντιοξειδωτική δράση και καταπολεμά τις ελεύθερες ρίζες, βιταμίνη E, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος και στον έλεγχο των μυϊκών λειτουργιών. Επίσης διαθέτει σύμπλεγμα βιταμινών B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12), οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της υγείας του δέρματος, των μαλλιών και των μυών και προωθούν την ανάπτυξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (αυτότροφες ή ετερότροφες) και την παρουσία CO_2 και γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης, το προφίλ των βιταμινών μεταβάλλεται (Becerra G. et al, 1999, Brown MR. et al, 1997).

2.5 Σύνοψη

Το μικροφύκος *C. pyrenoidosa* διαθέτει πλούσιο περιεχόμενο αξιοσημείωτων συστατικών, όπως χρωστικών, βιταμινών, λιπαρών και πρωτεϊνών, υψηλής βιολογικής αξίας, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Η ανάκτηση, συνεπώς, αυτών των συστατικών αποτελεί ζήτημα υψηλού ενδιαφέροντος που όμως δυσχεραίνεται από τη δυσκαμψία και τη σκληρότητα του κυτταρικού τοιχώματος του. Έτσι, η ανάπτυξη και αξιοποίηση μεθόδων διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος για βελτιστοποίηση της εκχύλισης αυτών των συστατικών είναι μεγάλης σημασίας και χρηστικότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης

3.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί, τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικά κύτταρα με σκληρά κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες αλλά ταυτόχρονα επιτρέπουν την ανταλλαγή απαραίτητων ουσιών. Ωστόσο, για να επιτευχθεί η μεγιστοποίηση της ανάκτησης χρήσιμων ουσιών από το εσωτερικό των κυττάρων των μικροφυκών, είναι αναγκαία η προεπεξεργασία τους, η οποία μπορεί να γίνει πολύ απαιτητική, ανάλογα με την δομή του κυτταρικού τοιχώματος, το μέγεθος του κυττάρου αλλά και το σχήμα του μικροφύκου. Έτσι, αυτή την στιγμή, είναι διαθέσιμη μια ποικιλία μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης, που χωρίζονται στις μηχανικές μεθόδους και τις μη μηχανικές, δηλαδή τις χημικές και βιολογικές, ενώ παράλληλα νέες μέθοδοι επεξεργασίας μελετώνται. Σημειώνεται πως αρκετές φορές εφαρμόζεται συνδυασμός μηχανικών και μη μηχανικών μεθόδων κυτταρικής διάρρηξης προκειμένου να μειωθεί η κατανάλωση ενέργειας και να αυξηθεί η αποδοτικότητα της διάρρηξης.

3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μη μηχανικές μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης

Οι μη μηχανικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης επιστρατεύουν χημικά και βιολογικά μέσα, τα οποία αλληλεπιδρούν απευθείας με το κυτταρικό τοίχωμα ή τη μεμβράνη, επιτρέποντας τη μεταφορά ενδοκυτταρικών ουσιών στο περιβάλλον μέσο και ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την εκχύλιση τους. Συνεπώς το κόστος αυτών των μεθόδων καθορίζεται μόνο από την ποσότητα και το είδος των υλικών που χρησιμοποιούνται, οπότε για λόγους εξοικονόμησης συνηθίζεται η ανάκτηση και η επαναχρησιμοποίηση τους (Dong et al., 2016).

3.2.1 Χημικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης

3.2.1.1 Οξέα – Βάσεις

Αυτές οι μέθοδοι είναι μια αποτελεσματική προεπεξεργασία για την εκχύλιση ενδοκυτταρικών ενώσεων όπως λιπαρών και χρωστικών. Η αντίδραση μεταξύ οξέος ή βάσης και κυτταρικού τοιχώματος υποβαθμίζει το κυτταρικό τοίχωμα επιτρέποντας την προσπέλαση του από τα ενδοκυτταρικά συστατικά να το διαπεράσουν και ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την εκχύλιση τους. Η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε αυξημένη είτε σε πίεση περιβάλλοντος και σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 100 °C, όπου φαίνεται να βελτιώνεται ο ρυθμός της αντίδρασης. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο οξύ σε αυτές τις μεθόδους είναι το H_2SO_4 και η συχνότερα χρησιμοποιούμενη βάση το $NaOH$. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι έχουν χαμηλή επιλεκτικότητα, καθώς απελευθερώνουν μια ποικιλία ενώσεων, οι οποίες είναι δύσκολο να διαχωριστούν. Παράλληλα, σε όξινα περιβάλλοντα οι χρωστικές ενδέχεται να υποβαθμίζονται (Mendes – Pinto et al., 2001, Miranda et al., 2012, Nguyen et al., 2009).

3.2.1.2 Ιονικά διαλύματα

Η χρήση ιονικών διαλυμάτων είναι μια σχετικά νέα μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης. Τα ιονικά διαλύματα έχουν την δυνατότητα να διαταράσσουν τις διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων από τις οποίες αποτελείται η κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας έτσι στον διαλύτη να εισχωρήσει στο κύτταρο και να διευκολυνθεί με αυτόν τον τρόπο η εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Τα ιονικά διαλύματα είναι άλατα, που αποτελούνται από σχετικά μεγάλα ασύμμετρα οργανικά κατιόντα και μικρά ανόργανα ή οργανικά ανιόντα, τα οποία παραμένουν σε υγρή φάση σε θερμοκρασίες μεταξύ 0 °C - 140 °C. Τα διαλύματα αυτά έχουν μοναδικές ιδιότητες, όπως χαμηλή πτητικότητα, υψηλή θερμοχωρητικότητα, ευκολία ανάκτησης τους, υψηλή απόδοση εκχύλισης

και χαμηλούς χρόνους αντίδρασης, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για εφαρμογές στην εκχύλιση συστατικών από μικροφύκη (Praveenkumar et al., 2015). Παρόλ' αυτά, η υψηλή τιμή τους και η τοξικότητά τους αποτελούν εμπόδια για την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες.

3.2.1.3 Οξείδωση

Οξειδωτικοί παράγοντες, όπως το H_2O_2 και το όζον αντιδρούν με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας σε υποβάθμιση και στην συνέχεια σε διάρρηξή του. Αυτή η τεχνική προεπεξεργασίας μπορεί να αυξήσει σημαντικά την αποδοτικότητα της εκχύλισης, όμως είναι σημαντικό ο χρόνος αντίδρασης να παραμείνει μικρός προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των εκχυλισμένων ενώσεων (Concas et al., 2015).

3.2.1.4 Επιφανειοδραστικές ουσίες (Surfactant)

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στα ανιόντα, τα κατιόντα, τις μη ιονικές ενώσεις και τις διπολικές ενώσεις, οι οποίες διακρίνονται από τα υδρόφιλα ή υδρόφοβα συστατικά τους. Έτσι, λόγω του φορτίου τους, αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και τελικά προκαλούν τη διάρρηξη του, με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της εκχύλισης των ενδοκυτταρικών συστατικών (Nasirpour et al., 2014).

3.2.2 Βιολογικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης

3.2.2.1 Ενζυμική υδρόλυση

Η ενζυμική υδρόλυση είναι μια μέθοδος κυτταρικής διάρρηξης, η οποία βασίζεται στην μετατροπή των υδατανθράκων σε μονομερή σάκχαρα ή στη μετατροπή των πρωτεϊνών σε αμινοξέα, προκαλώντας τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, μετά την διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος τα ενδοκυτταρικά συστατικά, μη συναντώντας κάποιο φράγμα, εκχυλίζονται με μεγαλύτερη ευκολία. Ο τύπος του ενζύμου είναι ο βασικός παράγοντας λειτουργικού κόστους και καθορίζει τις συνθήκες τις διεργασίας, όπως την θερμοκρασία, το pH, το χρόνο, την ανάδευση και τη συγκέντρωση ενζύμου και βιομάζας. Ωστόσο, η ενζυμική υδρόλυση υπερτερεί έναντι της όξινης ή βασικής υδρόλυσης καθώς παρουσιάζει υψηλή επιλεκτικότητα, υψηλή απόδοση, ευκολία μετατροπής της διεργασίας σε μεγάλης κλίμακας και χαμηλό κόστος επένδυσης, ενώ υστερεί ως προς τη δυσκολία ανάκτησης του ενζύμου, το υψηλό κόστος του ενζύμου και τους υψηλούς χρόνους εκχύλισης. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα για ενζυμική υδρόλυση είναι οι κυτταρινάσες, οι γλυκοσιδάσες, οι αμυλάσες, οι πρωτεάσες, οι ξυλάσες, οι πεπτιδάσες και οι λιπάσες (Lam and Lee, 2015).

3.2.2.2 Χρήση μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι βακτήρια, κυανοβακτήρια, ιοί, ή ακόμα και μικροφύκη. Αυτοί οι οργανισμοί έχει παρατηρηθεί ότι επιτίθενται και καταστρέφουν κύτταρα στόχους, κυρίως με την έκκριση εξωκυτταρικών αλληλοπαθητικών ουσιών. Τελικά, η διάρρηξη που προκαλούν στο κύτταρο επιφέρει την διευκόλυνση της μεταφοράς μάζας ή με άλλα λόγια την διευκόλυνση της εκχύλισης των ενδοκυτταρικών συστατικών. (Demuez et al, 2015).

3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μηχανικές μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης

Οι μηχανικές μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης απαιτούν προσφορά ενέργειας, με την μορφή δυνάμεων διάτμησης, ηλεκτρικών παλμών, κυμάτων ή θερμότητας και προκαλούν διάρρηξη του

κυττάρου, ευνοώντας έτσι την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Παρότι είναι ενεργοβόρες παρέχουν γενικά υψηλές αποδόσεις ανάκτησης με δυνατότητα ελέγχου και επέκτασης σε μεγαλύτερης κλίμακας διατάξεις. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, πως λόγω των έντονων συνθηκών επεξεργασίας αυτών των μεθόδων, δεν είναι κατάλληλες για εκχύλιση πτητικών ενδοκυτταρικών ενώσεων.

3.3.1 Με προσφορά ενέργειας μέσω κυμάτων

3.3.1.1 Επεξεργασία με υπερήχους

Κατά την επεξεργασία με υπερήχους, δύο κύριοι μηχανισμοί επιδρούν στην διάρρηξη των κυττάρων, η σπηλαιώση και στη συνέχεια η διάδοση κρουστικών κυμάτων. Συγκεκριμένα, η διάδοση κρουστικών κυμάτων σχηματίζει ρεύμα πίδακα στο περιβάλλον μέσο, προκαλώντας την διάρρηξη των κυττάρων λόγω διατμητικών τάσεων και διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών. (Gunerken et al., 2015).

3.3.1.2 Επεξεργασία με μικροκύματα

Ο βασικός μηχανισμός διάρρηξης των κυττάρων με επεξεργασία με μικροκύματα είναι η αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων με διηλεκτρικά και πολικά μόρια, με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας και της εσωτερικής πίεσης του κυττάρου και τελικά την διάρρηξη του, γεγονός που διευκολύνει την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Η συχνότητα κυμαίνεται από 0.3 – 300 GHz, αλλά για την επεξεργασία μικροφυκών η συχνότερα χρησιμοποιούμενη συχνότητα είναι τα 2450 MHz (Gunerken et al., 2015). Τα βασικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος επεξεργασίας, η υψηλή απόδοση διάρρηξης και η σχετικά χαμηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheng et al., 2013). Σημειώνεται ότι λόγω των υψηλών ρυθμών θέρμανσης που παράγονται, μειώνονται αποτελεσματικά ο χρόνος επεξεργασίας και η απαίτηση σε διαλύτη (Amarni and Kadi, 2010).

3.3.1.3 Εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF)

Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροδιάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος του μικροφύκου, όταν σε αιώρημα αυτού, που τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, εφαρμόζεται εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, που προκαλεί τη δημιουργία κρίσιμου ηλεκτρικού δυναμικού, λόγω του προσανατολισμού των θετικών και αρνητικών ιόντων εντός του κυττάρου, γεγονός που τελικά οδηγεί την δημιουργία πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα και ευνοεί την μεταφορά συστατικών από το εσωτερικό στο εξωτερικό του κυττάρου. Το μέγεθος και ο αριθμός των πόρων που δημιουργούνται συσχετίζεται άμεσα με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τους παλμούς, ενώ από τους ίδιους παράγοντες εξαρτάται και η μονιμότητα της ηλεκτροδιάτρησης (Gunerken et al., 2015).

3.3.2 Διάρρηξη με θερμικές μεθόδους

3.3.2.1 Έκρηξη ατμού (Steam explosion)

Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, η πρώτη ύλη εκτίθεται σε ατμό 180 – 240 °C (P~1.03 - 3.45 MPa) για αρκετά λεπτά και στη συνέχεια υποβάλλεται σε αποσυμπίεση σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η έκρηξη, η οποία συμβαίνει λόγω της απότομης αποσυμπίεσης, προκαλεί διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και συνεπώς έκθεση των ενδοκυτταρικών συστατικών, γεγονός που ευνοεί την εκχύλιση τους (Nurra et al., 2014).

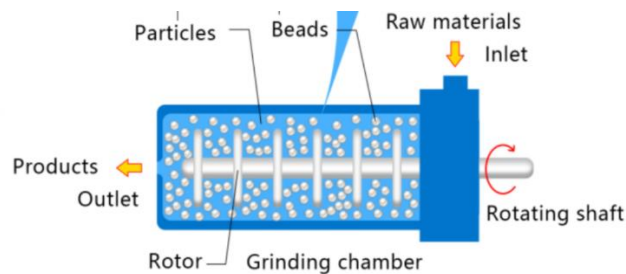
3.3.2.2 Λυοφιλίωση (Freeze drying)

Η λυοφιλίωση αποτελεί μια μέθοδο αφυδάτωσης, που γενικά χρησιμοποιείται για διατήρηση και συντήρηση τροφίμων και βιομάζας. Ωστόσο, λόγω της απόψυξης, που έπεται, της διαστολής του ενδοκυτταρικού νερού κατά την κατάψυξη μπορεί να προκληθεί διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος, δημιουργώντας έτσι μια δίοδο μεταφοράς των ενδοκυτταρικών συστατικών προς το εξωτερικό του κυττάρου (Lawrenz et al., 2011).

3.3.3 Με εφαρμογή διατμητικής τάσης

3.3.3.1 Άλεση με σφαιρίδια (Bead milling)

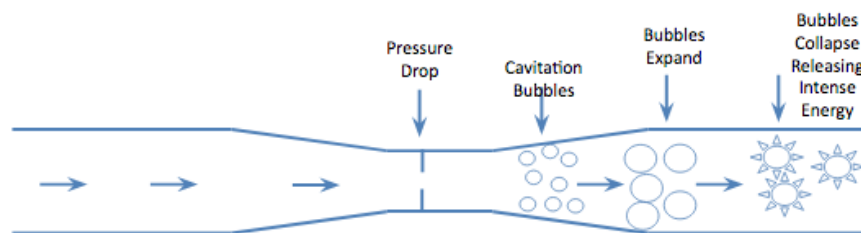
Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, τα κύτταρα υποβάλλονται σε απότομη συμπίεση που προκαλείται από συμπαγή σφαιρίδια, τα οποία κινούνται με υψηλές ταχύτητες (Gunerken et al., 2015). Ο θάλαμος επεξεργασίας είναι γεμάτος με συμπαγή σφαιρίδια (μέσα άλεσης), τα οποία αναδύονται από την μονάδα ανάδευσης και πιέζουν την τροφοδοσία των κυττάρων των μικροφυκών, μέσω δυνάμεων πίεσης και διατμητικών τάσεων. Αυτή η μέθοδος διάρρηξης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική ενώ διευκολύνει σημαντικά την πρόσβαση του διαλύτη στο εσωτερικό του κυττάρου. Παράλληλα, λόγω της υψηλής απόδοσης της μεθόδου ακόμα και σε λειτουργία ενός περάσματος από τον θάλαμο επεξεργασίας, έχει υψηλές δυνατότητες για βιομηχανικές εφαρμογές (Taleb et al., 2016).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διάρρηξης με άλεση με σφαιρίδια

3.3.3.2 Υδροδυναμική σπηλαιώση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην δημιουργία του φαινομένου της σπηλαιώσης σε ένα ομοιογενές υγρό μέσο, μέσω της δημιουργίας μικροφουσαλίδων. Οι μικροφουσαλίδες δημιουργούνται όταν η πίεση ελαττώνεται κάτω από την τάση ατμών του νερού, στο σημείο όπου η διάμετρος της διάταξης είναι η μικρότερη δυνατή. Μόλις η πίεση επανέλθει πάνω από την τάση ατμών, οι μικροφουσαλίδες καταρρέουν, προκαλώντας κρουστικά κύματα που στιγμιαία αυξάνουν την πίεση (100 – 5000 atm) και τη θερμοκρασία (500 – 15000 K), με αποτέλεσμα τη διάρρηξη των κυττάρων των μικροφυκών και άρα την διευκόλυνση της εκχύλισης των ενδοκυτταρικών συστατικών (Lee et al., 2015a, Lee and Han, 2013).



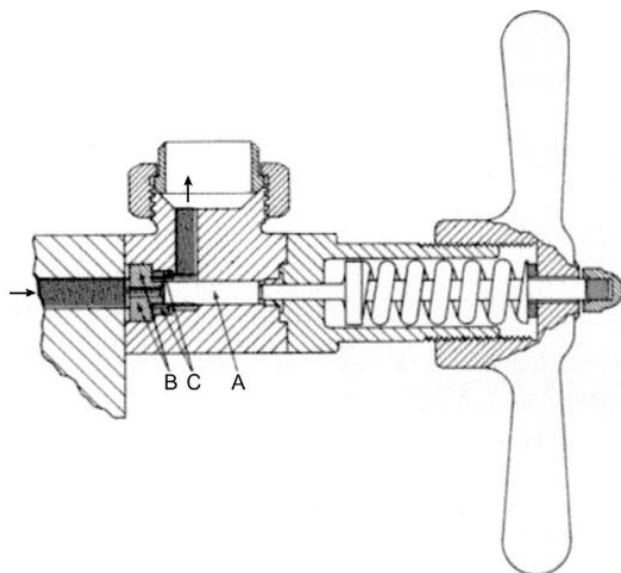
Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της Υδροδυναμικής σπηλαίωσης

3.3.3.3 Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης (ΗΡΗ)

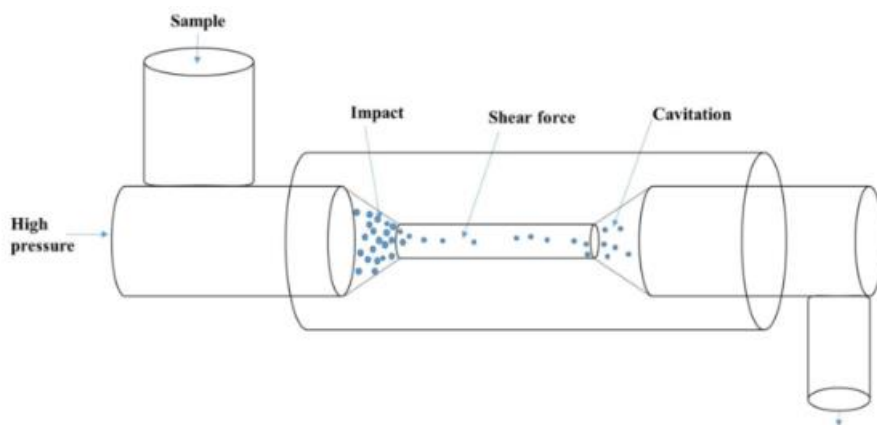
Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μια μέθοδος με υψηλή δυνατότητα εφαρμογής σε επεξεργασίες μεγαλύτερης κλίμακας. Οι βασικές παράμετροι της διεργασίας είναι η πίεση επεξεργασίας και ο αριθμός των διελεύσεων του ρευστού από τον Ομογενοποιητή και μπορεί να εφαρμοστεί σε αιωρήματα υψηλής συγκέντρωσης (20-25% w/w), ενώ είναι κατάλληλη για επεξεργασία κυττάρων με σκληρά κυτταρικά τοιχώματα, όπως αυτό της *C. pyrenoidosa* (Olmstead et al., 2013). Το διάλυμα στο οποίο εφαρμόζεται ομογενοποίηση υψηλής πίεσης ωθείται εντός του ομογενοποιητή να ρεύσει σε πολύ μεγάλη ταχύτητα από ένα πολύ στενό διάκενο. Ο ομογενοποιητής αποτελείται από μια αντλία υψηλής πίεσης και την κεφαλή του ομογενοποιητή. Η αντλία είναι, συνήθως, παλινδρομική θετικής εκτόπισης και κατά αυτή την μέθοδο επεξεργασίας απαιτείται υψηλή πίεση, στο εύρος 20–70 MPa, ώστε να προσπεραστεί η τριβή στην κεφαλή του ομογενοποιητή. Στην κεφαλή του ομογενοποιητή υπάρχει το συγκρότημα στενού διακένου (βαλβίδα ομογενοποίησης), το οποίο ανάλογα με τον σχεδιασμό, διατίθεται σε διαφορετικές μορφές. Η κεφαλή επίσης μπορεί να περιλαμβάνει μια βαλβίδα, εάν η ομογενοποίηση είναι ενός σταδίου, ή δύο βαλβίδες σε σειρά εάν η ομογενοποίηση είναι δύο σταδίων. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η διάρρηξη των κυττάρων με αυτή την μέθοδο είναι:

- η δημιουργία διατμητικών τάσεων στο ρευστό λόγω των βαθμίδων ταχύτητας
- η πρόσκρουση των κυττάρων στις σκληρές επιφάνειες της βαλβίδας
- η εμφάνιση του φαινομένου της σπηλαίωσης, καθώς όταν το υγρό διέρχεται από το διάκενο, επιταχύνεται, με αποτέλεσμα τη μείωση της πίεσης. Σημειώνεται ότι τοπικά η πίεση μπορεί να πέσει και κάτω από την τάση ατμών του νερού, συνεπώς είναι πιθανό να παρατηρηθεί και εξάτμιση. Οι φυσαλίδες ατμού που σχηματίζονται, διαστέλλονται και στην συνέχεια καταρρέουν, δημιουργώντας κρουστικά κύματα, γεγονός που συμβάλει στην διάρρηξη των κυττάρων.

Καθώς επιτυγχάνεται με την Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης διάρρηξη του κυττάρου, διευκολύνεται η πρόσβαση του διαλύτη στο εσωτερικό του κυττάρου και συνεπώς ευνοείται η εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών (Lander et al., 2000).



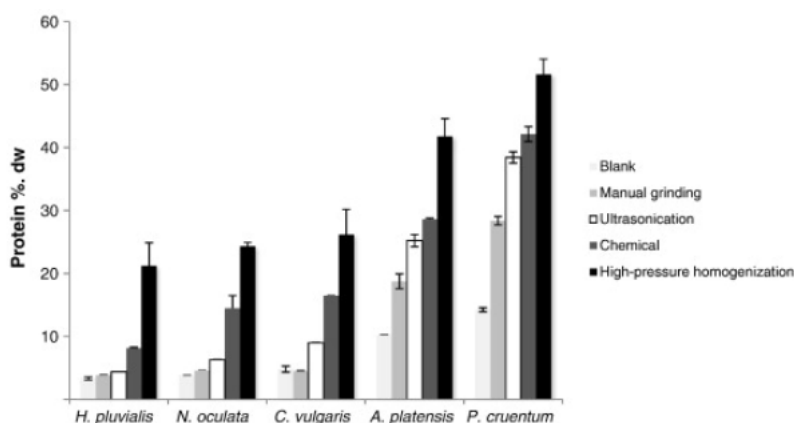
Εικόνα 7. Κεφαλή Ομογενοποιητή Υψηλής Πίεσης. A: Έμβολο Πίεσης, B: Θέση βαλβίδας, C: Σημείο διέλευσης του υγρού (Berk Z., 2018)



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ομογενοποίησης με υψηλή πίεση

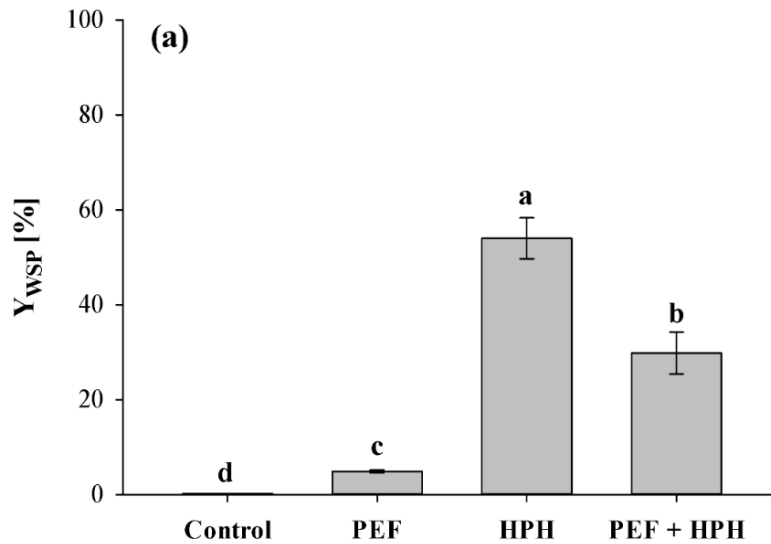
Σε μελέτη των Carl Safi et al., 2014, συγκρίθηκαν διάφορες μέθοδοι κυτταρικής διάρρηξης σε πέντε διαφορετικά μικροφύκη, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium cruentum* και *Arthrospira plantensis*. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν η χειροκίνητη άλεση, η εφαρμογή υπερήχων, η επεξεργασία με αλκαλικό μέσο και η εφαρμογή ομογενοποίησης υψηλής πίεσης και τα αιωρήματα κυττάρων που παρασκευάστηκαν ήταν 2% w/w. Συγκεκριμένα, κατά τη χειροκίνητη άλεση, ξηρά κύτταρα μικροφυκών αλέστηκαν με γουδί για 5 min και στην συνέχεια δημιουργήθηκε αιώρημα αυτών 2% w/w, σε απιονισμένο νερό και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 2 h. Στην περίπτωση των υπερήχων, το αιώρημα 2% w/w (σκόνη κυττάρων σε απιονισμένο νερό), υποβλήθηκε σε υπερήχους συχνότητας 20 kHz για συνολικό χρόνο επεξεργασίας 30 min, σε κύκλους των 5s υπερήχων και 15s ηρεμίας, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος. Στην περίπτωση της χημικής επεξεργασίας με

αλκαλικό μέσο, παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, με pH=12, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη διαλυτότητα των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας NaOH 2N, με ποσότητα του οποίου και σκόνη των κυττάρων, δημιουργήθηκε το αιώρημα 2% w/w, το οποίο αναδεύτηκε για 2 h στους 40 °C. Τέλος, στην περίπτωση της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης το αιώρημα 2% w/w (σκόνη κυττάρων σε απιονισμένο νερό) διήλθε 2 φορές από τον ομογενοποιητή σε πίεση 2700 bar. Από την σύγκριση των μεθόδων, η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης αποδείχθηκε η αποτελεσματικότερη στην εκχύλιση πρωτεϊνών, ενώ δεύτερη αποτελεσματικότερη μέθοδος ήταν η χημική επεξεργασία (Safi C. et al, 2014).



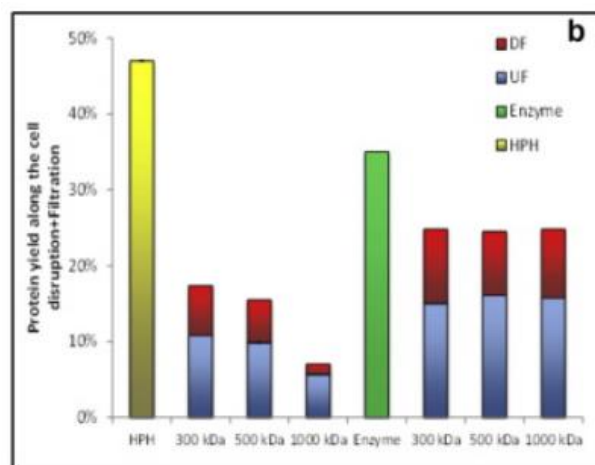
Σχήμα 1. Συγκέντρωση πρωτεϊνών των διάφορων μικροφυκών για κάθε είδος επεξεργασίας (Safi C. et al, 2014)

Σε μια άλλη μελέτη των Carullo et al., 2022, εξετάστηκε η εφαρμογή των μεθόδων των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) και της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (HPH) ξεχωριστά και ως συνδυασμός, σε αιώρημα κυττάρων του μικροφύκου *C. vulgaris* 1.2 g/L σε απιονισμένο νερό. Καθώς η μέθοδος HPH εμφανίζει το μειονέκτημα της χαμηλής επιλεκτικότητας και της χαμηλής καθαρότητας των εκχυλισμάτων που προκύπτουν έπειτα από επεξεργασία με αυτή, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε σε μια προσπάθεια να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα. Οι συνθήκες επεξεργασίας για την μέθοδο PEF ήταν $E=20$ kV/cm, $W_T=100$ kJ/kg και εύρος παλμού 5μs και για την μέθοδο HPH 150 MPa και 5 περάσματα. Στο πείραμα πραγματοποιήθηκε αρχικά υδατική εκχύλιση για 1h στους 25 °C και στην συνέχεια εκχύλιση σε οξικό αιθυλεστέρα για 3h στους 25 °C. Από τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνεται πως η αποτελεσματικότερη εκχύλιση πρωτεϊνών σημειώθηκε στην περίπτωση που εφαρμόστηκε μόνο η μέθοδος HPH. Προσπαθώντας να εξηγήσουν την υστέρηση της εφαρμογής του PEF, οι Carullo et al. υπέθεσαν πως οι πόροι που δημιουργούνται με το PEF δεν είναι επαρκώς μεγάλοι, ώστε να είναι διαπερατοί από πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους, ενώ όσον αφορά την υστέρηση του συνδυασμού των δυο μεθόδων υπέθεσαν πως οι πρωτεΐνες, ερχόμενες σε επαφή με τον αιθανικό αιθυλεστέρα υπέστησαν υποβάθμιση και μετουσίωση, με αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό τους να μην είναι διαλυτό στο νερό (Carullo et al, 2022).



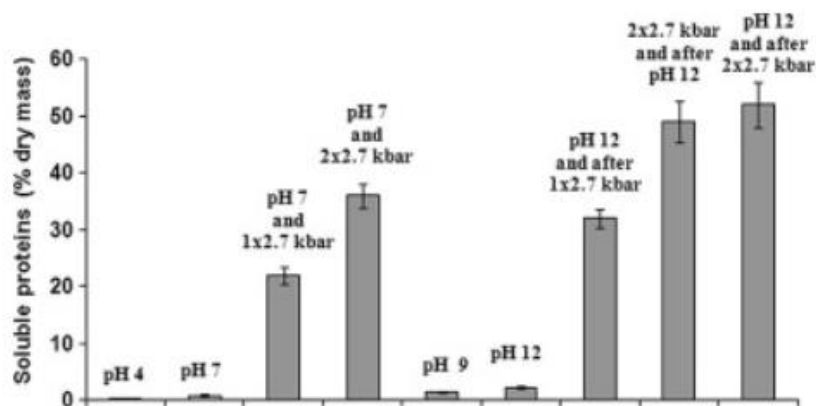
Σχήμα 2. Απόδοση των ανακτημένων υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών για τις διάφορες επεξεργασίες. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ($p \leq 0.05$) (Carullo et al, 2022)

Σε μελέτη των Safi et al, 2017, μελετήθηκε η ανάκτηση πρωτεϊνών από κύτταρα του μικροφύκου *Nannochloropsis gaditana*, αιώρημα 0.1% w/w των οποίων υποβλήθηκε σε δύο μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης, στην Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης και στην ενζυμική υδρόλυση, και στην συνέχεια τα υπερκείμενα ρευστά από τις δύο διεργασίες υποβλήθηκαν σε έναν συνδυασμό υπερδιήθησης/διαδιήθησης με διάφορα είδη μεμβρανών (1000 kDa, 500 kDa και 300 kDa). Όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα η Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης είναι πιο αποδοτική από την ενζυμική υδρόλυση και μάλιστα επιτυγχάνει ανάκτηση 49% των ολικών πρωτεϊνών της βιομάζας έναντι της ανάκτησης 35% που επιτυγχάνει η ενζυμική υδρόλυση (Safi et al, 2017).



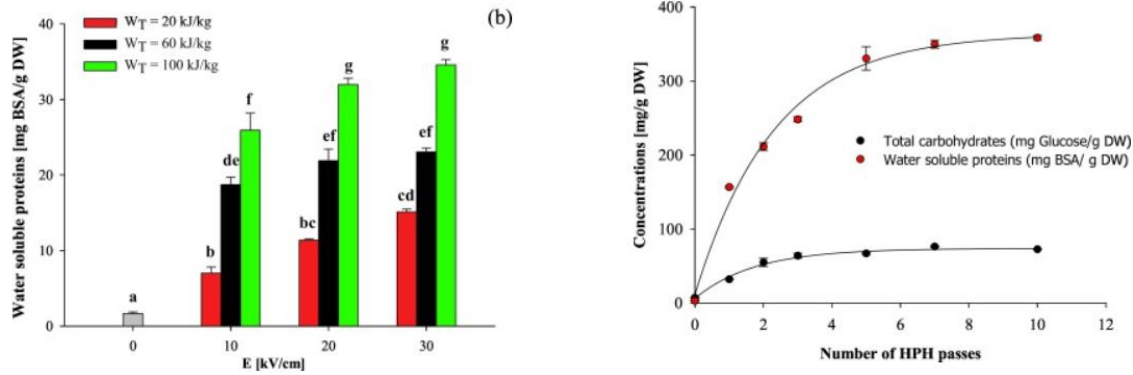
Σχήμα 3. Ανάκτηση πρωτεϊνών (%w/w ανακτημένων πρωτεϊνών από τις συνολικές πρωτεΐνες της βιομάζας) από το μικροφύκος *Nannochloropsis gaditana* με εφαρμογή Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης και Ενζυμικής Υδρόλυσης, ως μεθόδους κυτταρικής διάρρηξης και διήθηση 2 βημάτων (DF: diafiltration, UF: ultrafiltration) των αιωρημάτων με διάφορα είδη μεμβρανών (Safi et al, 2017)

Σε μελέτη των Ursu et al, 2014, μελετήθηκε η επίδραση του pH και της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης σε αιώρημα του μικροφύκου *C. vulgaris*. Συγκεκριμένα, σε αιώρημα 1.3 % w/w σκόνης των κυττάρων του μικροφύκου σε απιονισμένο νερό, εφαρμόστηκε η μέθοδος HPH με 2.7 kbar, για 1 και 2 περάσματα, και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7 και 12, χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 1M. Όπως παρατηρήθηκε, η HPH είναι εξαιρετικά αποδοτική για την απελευθέρωση των πρωτεϊνών από το εσωτερικό των κυττάρων *C. vulgaris*, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης πρωτεϊνών επιτεύχθηκε για pH=12 και για 4 περάσματα και συγκεκριμένα επιτεύχθηκε ανάκτηση του 98% των συνολικών πρωτεϊνών του μικροφύκου (Ursu et al, 2014).



Σχήμα 4. Επίδραση της διεργασίας εκχύλισης στην απόδοση παραλαβής διαλυτών πρωτεϊνών (Ursu et al, 2014)

Επίσης, σε μελέτη των Carullo et al, 2018, όπου μελετήθηκε η ανάκτηση ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως πρωτεϊνών και υδατανθράκων, από κύτταρα μικροφύκου *Chlorella vulgaris*, με εφαρμογή της μεθόδου των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων και της Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης, φάνηκε ότι η HPH είναι η πιο αποδοτική, καθώς προκάλεσε πλήρη διάρρηξη των κυττάρων σε μικρά θραύσματα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση όλου του ενδοκυτταρικού υλικού, ενώ στην περίπτωση του PEF, λόγω της δημιουργίας πόρων στο κύτταρο, απελευθερώθηκαν επιλεκτικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα, σε αιώρημα κυττάρων 1.2 % w/w, όσον αφορά στην μέθοδο PEF, δοκιμάστηκαν διάφορες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου (10-30 kV/cm) και διάφορες τιμές προσφερόμενης ειδικής ενέργειας (20 – 100 kJ/kg), ενώ όσον αφορά στην μέθοδο HPH εξετάστηκε η πίεση επεξεργασίας 150 MPa και εξετάστηκαν διάφοροι αριθμοί διελεύσεων από τον ομογενοποιητή (1-10). Από τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψε ότι με την μέθοδο PEF ανακτήθηκε το 5.2% w/w των ολικών πρωτεϊνών ενώ με την μέθοδο HPH προέκυψε απόδοση ανάκτησης ολικών πρωτεϊνών 10.3 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την απόδοση με χρήση της μεθόδου PEF (Carullo et al, 2018).



Σχήμα 5. Ανάκτηση πρωτεϊνών από κύτταρα του μικροφύκου *C. vulgaris* με εφαρμογή της μεθόδου των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων (αριστερά) και με εφαρμογή της μεθόδου της Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης(δεξιά) (Carullo et al, 2018)

Όπως φαίνεται, για την ανάκτηση πρωτεϊνών η μέθοδος HPH είναι η πιο αποτελεσματική, καθώς προκαλεί πλήρη διάρρηξη του κυττάρου, συνεπώς ακόμα και οι πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους μπορούν να εκχυλιστούν, με το μειονέκτημα, βέβαια, ότι τα εκχυλίσματά τους είναι χαμηλής καθαρότητας. Καθώς, όπως είναι γνωστό το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* βρίσκεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη, η ρύθμιση του pH=13 με πυκνό NaOH, είναι απαραίτητη για μεγιστοποίηση του ποσοστού ανάκτησης, αφού σε αλκαλικό περιβάλλον τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών πραγματοποιούν αντίδραση σαπωνοποίησης με το NaOH και διασπώνται με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν τις πρωτεΐνες. Παράλληλα, η ρύθμιση του pH=13 ευνοεί και την αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της κινητικής της εκχύλισης των πρωτεϊνών από ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα με HPH κύτταρα *C. pyrenoidosa*, η μελέτη της επίδρασης των συνθηκών επεξεργασίας (πίεση και αριθμός διελεύσεων) και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην ανάκτηση πρωτεϊνών, η μεγιστοποίηση της ανάκτησης των πρωτεϊνών και τελικά η παραλαβή καθαρότερων, σε πρωτεΐνη, εκχυλισμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά & Μέθοδοι

4.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάκτηση πρωτεϊνών από το μικροφύκος *Chlorella pyrenoidosa*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην εκχύλιση των πρωτεϊνών, στο εύρος 20 – 40 °C, σε αιώρημα κυττάρων *C. pyrenoidosa*, το οποίο πρώτα είχε υποστεί επεξεργασία με την μέθοδο της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (HPH), ενώ μελετήθηκε και η εξέλιξη του φαινομένου με το χρόνο. Εκτός από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην εκχύλιση των πρωτεϊνών, μελετήθηκε και η επίδραση διάφορων συνθηκών επεξεργασίας, δηλαδή διαφορετικών πιέσεων επεξεργασίας και διαφορετικών αριθμών περασμάτων.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν μετρήθηκαν επίσης και οι ολικοί υδατάνθρακες, καθώς όπως αναφέρθηκε το μικροφύκος *C. pyrenoidosa* περιέχει σημαντική ποσότητα αυτών, αλλά και οι χλωροφύλλες, οι οποίες είναι, επίσης, ένα κυρίαρχο συστατικό του κυττάρου του μικροφύκου. Παράλληλα, μελετήθηκαν και τα στερεά υπολείμματα των δειγμάτων.

Στην συνέχεια, έγινε προσπάθεια για παραλαβή καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων, όπου πραγματοποιήθηκε αρχικά αιθανολική εκχύλιση για απομάκρυνση των χλωροφυλλών και στην συνέχεια υδατική εκχύλιση για ανάκτηση των πρωτεϊνών.

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* 2.5 % w/w

Για τη διεξαγωγή της μελέτης παρασκευάστηκε αιώρημα κυττάρων 2.5 % w/w, με χρήση ξηρής σκόνης του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* (Z-Company BV, NATURAL & HEALTHY, Nuenen, The Netherlands). Σε κωνική φιάλη των 1000 mL αναμείχθηκαν 585 mL απιονισμένου νερού και 15 g ξηρής σκόνης του μικροφύκου, ώστε να τηρείται η σταθμική αναλογία $\frac{\text{ξηρό μικροφύκος}}{\text{απιονισμένο νερό}} = \frac{1}{40}$, και αφέθηκαν υπό έντονη μαγνητική ανάδευση για 10 min στους 25 °C, χωρίς πωματισμό του στομίου της κωνικής φιάλης, έως ότου τα κύτταρα ενυδατωθούν πλήρως. Ο χρόνος ανάδευσης παρατηρήθηκε πως δεν επηρεάζει την εκχύλιση των πρωτεϊνών.

4.3 Επεξεργασία αιωρήματος με Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης

Μέρος του αιωρήματος παρέμεινε ανεπεξέργαστο ώστε να μπορεί να συγκριθεί με το επεξεργασμένο μέρος, ως προς την μεταβολή και την επίδραση των παραμέτρων του πειράματος. Στο υπόλοιπο μέρος εφαρμόστηκε η μέθοδος της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, η οποία αποτελεί τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα για διάτρηση των κυττάρων, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας τους και συνεπώς την αύξηση του ρυθμού εκχύλισης. Έτσι, ποσότητα του αιωρήματος του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* 2.5 % w/w, υπέστη επεξεργασία σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (Invensys APV-1000, London, UK). Όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκαν διάφορες συνθήκες επεξεργασίας στον ομογενοποιητή, και συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι πιέσεις 400, 600 και 800 bar για 1 και 4 περάσματα σε κάθε πίεση, αντίστοιχα,

ενώ μελετήθηκε επίσης η ακραία συνθήκη των 800 bar και 10 περασμάτων, ως η συνθήκη στην οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη διάρρηξη, όπως προέκυψε πειραματικά.



Εικόνα 9. Ομογενοποιητής Υψηλής Πίεσης SPX APV 1000

Πίνακας 3. Συνθήκες επεξεργασίας με τη μέθοδο της Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης

Κωδικοποίηση επεξεργασίας	Πίεση επεξεργασίας (bar)	Αριθμός περασμάτων
400/1	400	1
400/4	400	4
600/1	600	1
600/4	600	4
800/1	800	1
800/4	800	4
800/10	800	10

4.4 Υδατική εκχύλιση

Ως υδατοδιαλυτές ουσίες οι πρωτεΐνες ανακτήθηκαν σε υδατικό περιβάλλον, δηλαδή στο αιώρημα 2.5 % w/w που παρασκευάστηκε και επεξεργάστηκε. Σημειώνεται ότι για κάθε δείγμα έγιναν 2 επαναλήψεις, ώστε να εκτιμηθεί και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

4.4.1 Ρύθμιση pH

Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών στο κύτταρο της *C. pyrenoidosa* βρίσκεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών, ενώ μικρότερο ποσοστό εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα και στο κυτόπλασμα. Για την ανάκτηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες, οι οποίες αποτελούνται από φωσφολιπίδια, απαιτείται αλκαλικό περιβάλλον καθώς τα φωσφολιπίδια πραγματοποιούν αντίδραση σαπωνοποίησης με το NaOH και διασπώνται με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν τις πρωτεΐνες. Έτσι, με πυκνό διάλυμα NaOH 6N

ρυθμίστηκε το pH = 13, ως η τιμή pH με την βέλτιστη απόδοση, όπως προέκυψε πειραματικά, για την ανάκτηση πρωτεϊνών από το κύτταρο *C. pyrenoidosa*.

4.4.2 Εκχύλιση δειγμάτων

Τα επεξεργασμένα δείγματα, αφότου ρυθμίστηκε και το pH τους παρέμειναν σε υδατόλουτρο για 24 h, σε τρεις θερμοκρασίες, στους 20 °C, στους 30 °C και στους 40 °C και λήφθηκαν δείγματα στις 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 16, 18, 20, 22 και 24 h.

4.4.3 Φυγοκέντρηση

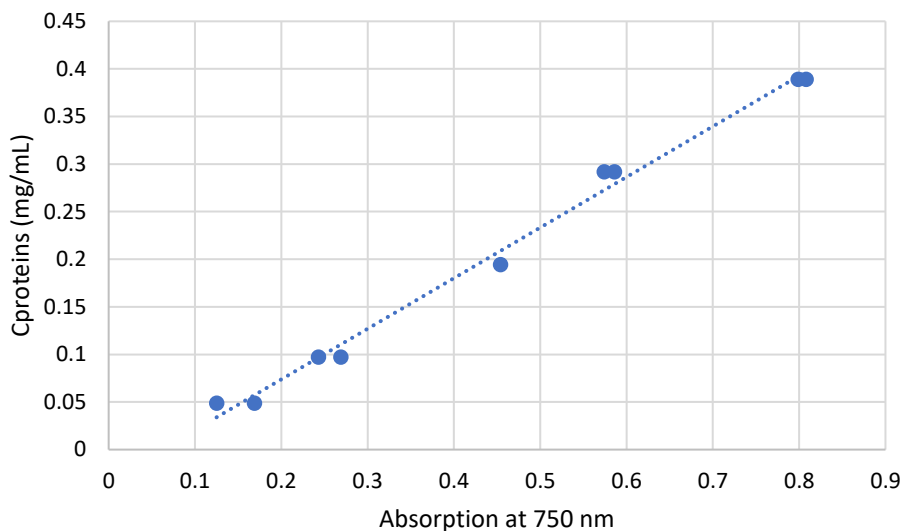
Μετά τη λήψη δείγματος αιωρήματος 2 mL από κάθε διαφορετική συνθήκη επεξεργασίας, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν για 10 min στα 10000 g και στην συνέχεια απορριπτόταν το ίζημα και αποθηκευόταν το υπερκείμενο υγρό. Για την φυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος Thermo Scientific™ Heareus™ Megafuge™ 16R (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America).



Εικόνα 10. Φυγόκεντρος Thermo Scientific™ Heareus™ Megafuge™ 16R

4.4.4 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Lowry. Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα Lowry, το οποίο αποτελείται από 2 mL υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 20 mg NaK-Tartrate/mL, 2 mL υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 10 mg CuSO₄ /mL και 196 mL υδατικού διαλύματος Buffer, περιεκτικότητας 4 mg NaOH/mL και περιεκτικότητας 20 mg Na₂CO₃/mL. Στην συνέχεια, σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 200 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, δηλαδή υπερκείμενου υγρού μετά την φυγοκέντρηση, και 1 mL διαλύματος Lowry, τα οποία και αναδεύονται καλά, ενώ παρασκευάζεται και τυφλό δείγμα υποκαθιστώντας το δείγμα με 200 μL H₂O. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται για 15 min απουσία φωτός. Στην συνέχεια, προστίθενται 100 μL διαλύματος Folin 1N και οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 30 min. Η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται φωτομετρικά στα 750 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis HitachiU 2900, μηδενίζοντας με το τυφλό δείγμα. Η σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης πρωτεϊνών δίνεται από την παρακάτω καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με χρήση της πρότυπης ουσίας BSA (Bovine Serum Albumine).



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς πρωτοκόλλου μέτρησης πρωτεϊνών

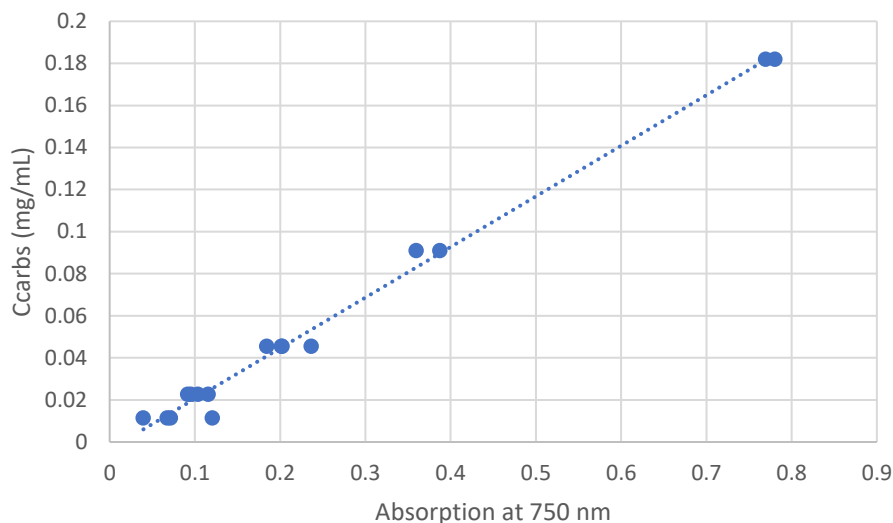
$$C_{\text{πρωτεϊνών}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 0.5316 * A_{750} - 0.0326, R^2 = 0.9918 \quad (4)$$

4.4.5 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών της πρώτης ύλης, ανεπεξέργαστο αιώρημα υπέστη επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. Η πίεση ήταν ρυθμισμένη στα 800 bar και το δείγμα διήλθε από τον ομογενοποιητή 10 φορές. Στην συνέχεια, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 13 και μετέπειτα τα δείγματα επώαστηκαν για 24h στους 40°C. Τέλος, οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με το πρωτόκολλο Lowry.

4.4.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες στα εκχυλίσματα, για τους χρόνους 0, 6 και 24 h, προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της φαινόλης και του θειϊκού οξέος. Συγκεκριμένα για την μέτρηση, εντός απαγωγού στρώθηκε ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού και τοποθετήθηκε επάνω σε αυτό μια πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 φρεάτων. Σε κάθε φρέαρ της πλάκας μικροτιτλοδότησης προστέθηκαν 50 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Παράλληλα, σε τρία φρέατα προστέθηκαν 50 μL απιονισμένου νερού, ως τυφλό δείγμα. Σε κάθε φρέαρ που περιείχε δείγμα (ή απιονισμένο νερό) προστέθηκαν, με τη χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου, 150 μL διαλύματος πυκνού θειϊκού οξέος 95 % w/v. Σε καθένα από τα παραπάνω φρέατα προστέθηκαν, με τη χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου, 30 μL υδατικού διαλύματος φαινόλης 5 % w/v. Με την βοήθεια του ρύγχους της πιπέτας αναμείχθηκε καλά το περιεχόμενο κάθε φρέατος. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης αφέθηκε να επιπλεύσει σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 90 °C για 10 min. Μετά την πάροδο των 10 min, η πλάκα μικροτιτλοδότησης αφαιρέθηκε από το υδατόλουτρο, τοποθετήθηκε σε απαγωγό, καλύφθηκε και αφέθηκε να ψυχθεί για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο της 1 h, η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού που δέχεται πλάκες μικροτιτλοδότησης και μετρήθηκε η απορρόφηση σε κάθε φρέαρ, σε μήκος κύματος 490 nm. Η σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης υδατανθράκων δίνεται από την παρακάτω καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με χρήση προτύπων διαλυμάτων γλυκόζης, συγκεντρώσεων 0,0625-1,0000 mM.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς πρωτοκόλλου μέτρησης υδατανθράκων

$$C_{\text{υδατανθράκων}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 0.2406 * A_{750} - 0.0035, R^2 = 0.991 \quad (5)$$

4.4.7 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων υδατανθράκων

Για τον προσδιορισμό των ολικών υδατανθράκων της πρώτης ύλης, ανεπεξέργαστο αιώρημα υπέστη επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. Η πίεση ήταν ρυθμισμένη στα 800 bar και το δείγμα διήλθε από τον ομογενοποιητή 10 φορές. Στην συνέχεια, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 13 και μετέπειτα τα δείγματα επωάστηκαν για 24h στους 40°C. Τέλος, οι ολικοί υδατάνθρακες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της φαινόλης και του θειϊκού οξέος, όπως εξηγείται παραπάνω.

4.5 Αιθανολική εκχύλιση

Για την ανάκτηση των χλωροφυλλών πραγματοποιήθηκε αιθανολική εκχύλιση καθώς αυτές είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες και όχι σε υδατικούς. Έτσι, τα δείγματα μετά την επεξεργασία τους στον ομογενοποιητή, φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 10000 g, στην συνέχεια το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε αιθανόλη. Ο όγκος της αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχούσε στον όγκο του απορριφθέντος υπερκείμενου υγρού.

4.5.1 Εκχύλιση δειγμάτων

Τα αναδιαλυμένα σε αιθανόλη δείγματα στην συνέχεια επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 30 °C, 40 °C, 50 °C και 60 °C, για 2 h. Ο χρόνος αυτός προέκυψε πειραματικά, με την απόδοση της εκχύλισης των χλωροφυλλών να μην αυξάνεται σημαντικά μετά τις 2 h, ενώ οι θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αιθανολική εκχύλιση επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενα πειράματα που έχουν διενεργηθεί στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

4.5.2 Προσδιορισμός ανακτημένων χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα

Για τον προσδιορισμό των ανακτημένων χλωροφυλλών, τα επεξεργασμένα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με αιθανόλη και στην συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 470, 649 και 664 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis HitachiU 2900. Ο υπολογισμός των ολικών χλωροφυλλών και καροτενοειδών πραγματοποιήθηκε βάσει των παρακάτω μαθηματικών σχέσεων (Lichtenthaler H.K.& Buschmann C, 2001)

$$C_a = 13.36 * A_{664} - 5.19 * A_{649} \quad (6)$$

$$C_b = 27.43 * A_{648} - 8.12 * A_{664} \quad (7)$$

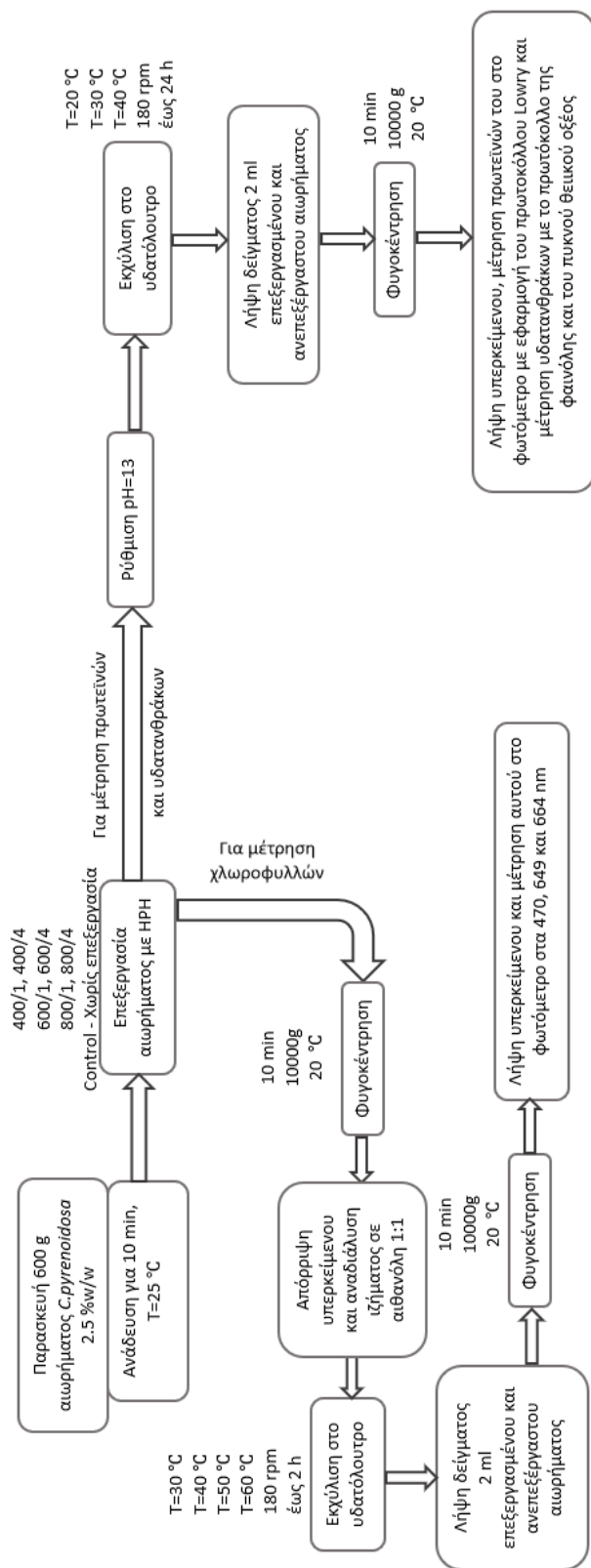
$$C_{chlorophylls} = C_a + C_b \quad (8)$$

4.5.3 Προσδιορισμός μέγιστων ανακτώμενων χλωροφυλλών

Για τον προσδιορισμό των ολικών χλωροφυλλών της πρώτης ύλης, ανεπεξέργαστο αιώρημα υπέστη επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. Η πίεση ήταν ρυθμισμένη στα 800 bar και το δείγμα διήλθε από τον ομογενοποιητή 10 φορές. Στην συνέχεια, ύστερα από ξήρανση υπό κατάψυξη, περίπου 125 mg ξηρού αιωρήματος επεξεργασμένου με την συνθήκη 800/10, ενυδατώθηκαν με 500 μ L απιονισμένο νερό και προστέθηκαν 4.5 mL αιθανόλης. 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 αιθανόλης, 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 και ο υπολογισμός των ολικών χλωροφυλλών έγινε με τις παραπάνω μαθηματικές σχέσεις (6, 7, 8).

4.6 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος των εκχυλισμάτων

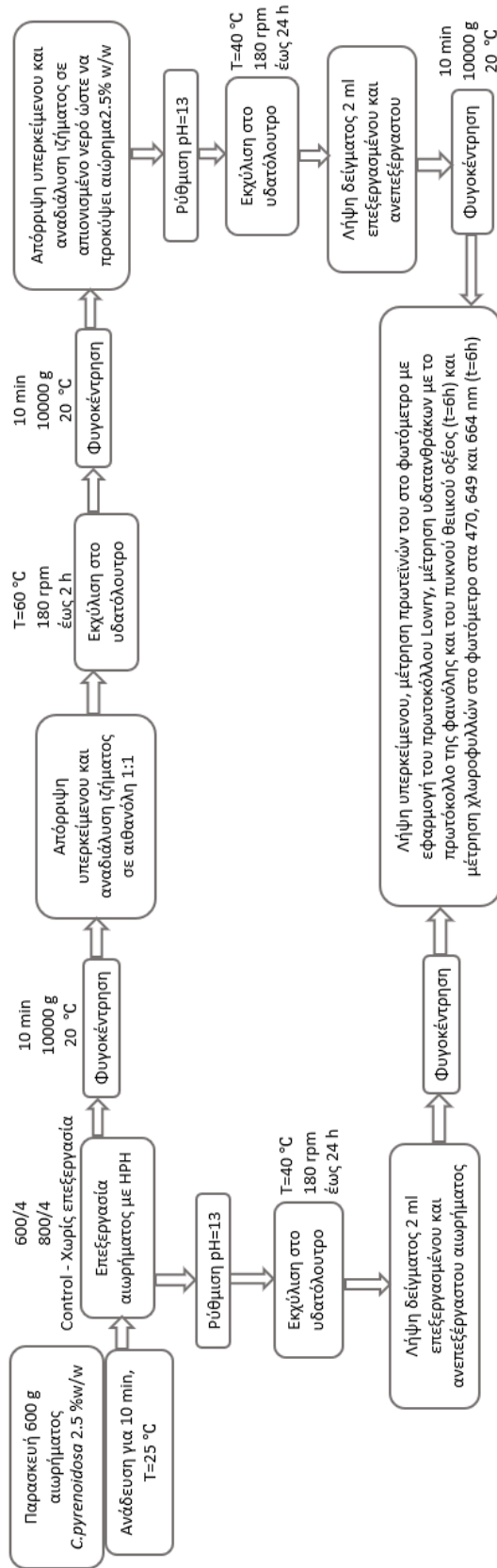
Σε προζυγισμένα δοχεία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της μάζας των εκχυλισμάτων τόσο της αιθανολικής, όσο και της υδατικής εκχύλισης. Για τα εκχυλίσματα της υδατικής εκχύλισης, προσδιορίστηκαν τα στερεά υπολείμματα για χρόνους 0, 1, 3, 5, 7, 16, 20 και 24 h, ενώ για τα εκχυλίσματα της αιθανολικής εκχύλισης, προσδιορίστηκαν τα στερεά υπολείμματα για χρόνους 0, 1 και 2 h. Τα δείγματα, στην συνέχεια, παρέμειναν στους 103 °C για 24 h, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του διαλύτη και μετρήθηκαν πάλι στον αναλυτικό ζυγό, ώστε να υπολογιστεί το στερεό τους υπόλειμμα.



Διάγραμμα 4. Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας της υδατικής και της αιθανολικής εκχύλισης

4.7 Συνδυαστικό πείραμα

Καθώς ο ρόλος του μεγαλύτερου ποσοστού των πρωτεϊνών του κυττάρου της *C. pyrenoidosa* είναι η μεταφορά των χλωροφυλλών για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης μέσω πρόσδεσης τους με αυτές, τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται έχουν πράσινο χρώμα. Προκειμένου να παραληφθούν καθαρότερα εκχυλίσματα σε πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε αρχικά αιθανολική εκχύλιση και στην συνέχεια υδατική εκχύλιση, καθώς οι χλωροφύλλες είναι διαλυτές στην αιθανόλη ενώ οι πρωτεΐνες όχι. Έτσι, παρασκευάστηκε αιώρημα κυττάρων *C. pyrenoidosa* 2.5% w/w και σε μέρος αυτού επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί επεξεργασία με πίεση 800 bar και 4 περάσματα, ως η βέλτιστη συνθήκη που μελετήθηκε ως προς την απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών, μέρος αυτού έμεινε ανεπεξέργαστο και τέλος ένα μέρος επεξεργάστηκε με μια ενδιάμεση συνθήκη των 600 bar με 4 περάσματα. Στην συνέχεια, μέρος των επεξεργασμένων και μη ποσοτήτων υποβλήθηκε σε υδατική μόνο εκχύλιση και το υπόλοιπο σε αιθανολική και στην συνέχεια σε υδατική. Σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν η εκχύλιση έγινε στους 60 °C για την αιθανολική εκχύλιση και στους 40 °C για την υδατική, καθώς αυτές ήταν οι θερμοκρασίες στις οποίες παρατηρήθηκαν η μεγαλύτερη ανάκτηση χλωροφυλλών και πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Έτσι, μετά την επεξεργασία τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 10000 g και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Ακολούθησε αιθανολική εκχύλιση όπως περιγράφεται παραπάνω, για 2 h, καθώς παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση των χλωροφυλλών ολοκληρώνεται στις 2 h και στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν πάλι για 10 min στα 10000 g, το ίζημα αναδιαλύθηκε σε απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψει αιώρημα 2.5 % w/w, και ακολούθησε 24ωρη υδατική εκχύλιση όπως περιγράφεται παραπάνω. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση των πρωτεϊνών τους, μέτρηση των χλωροφυλλών και των υδατανθράκων τους και μέτρηση των στερεών υπολειμμάτων τους και έγινε σύγκριση της περίπτωσης της υδατικής εκχύλισης και της αιθανολικής ακολουθούμενης από υδατική εκχύλιση.



Διάγραμμα 5. Διάγραμμα ροής συνδυαστικού πειράματος

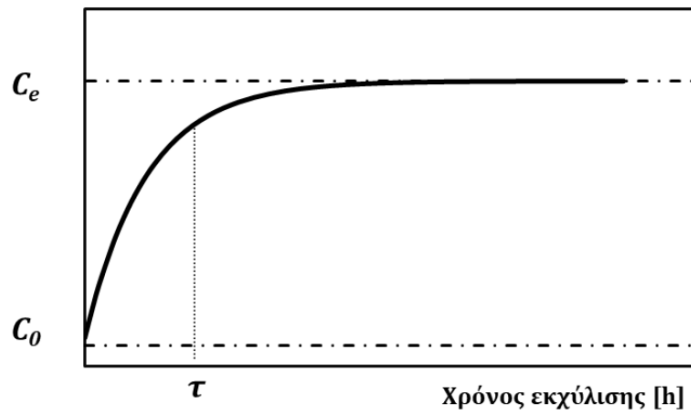
4.8 Μαθηματική μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων

4.8.1 Πρωτεΐνες

Η μελέτη της κινητικής του φαινομένου της εκχύλισης των πρωτεϊνών από τα κύτταρα του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* έγινε με την χρήση του παρακάτω εκθετικού μοντέλου πρώτης τάξης

$$C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

- Όπου C_e η τελική ανακτώμενη συγκέντρωση εκχυλισμένων πρωτεϊνών $\left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}\right)$ για $t \rightarrow \infty$
- C_o η αρχικά ανακτημένη συγκέντρωση εκχυλισμένων πρωτεϊνών $\left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}\right)$ για $t=0$. Σημειώνεται ότι η χρονική στιγμή $t=0$ θεωρήθηκε η στιγμή της ρύθμισης του pH στην τιμή 13, εφόσον επαληθεύτηκε πειραματικά ότι χωρίς την ρύθμιση του pH η απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών δεν μεταβάλλεται σημαντικά.
- t ο χρόνος εκχύλισης εκφρασμένος σε h
- τ ο χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης στον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3% του φαινομένου της εκχύλισης σε h



Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση της συνάρτησης $C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$

Το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε, καθώς παρουσίαζε ικανοποιητική προσαρμογή στην μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων, ερμηνεύοντας την εξέλιξη της εκχύλισης των πρωτεϊνών με τον χρόνο. Επιπλέον, οι παράμετροι C_e και τ προσφέρουν μια ικανοποιητική εικόνα για την απόδοση της εκχύλισης και το χρόνο ολοκλήρωσης της διεργασίας, καθώς από αυτές απορρέουν πληροφορίες για την σύγκριση των διαφορετικών επεξεργασιών τόσο ως προς την απόδοση όσο και ως προς τον χρόνο ολοκλήρωσης του φαινομένου. Παρόμοια η παράμετρος C_o , δίνει πληροφορίες για την σύγκριση των διαφορετικών επεξεργασιών κατά την έναρξη της εκχύλισης.

4.8.2 Συνολικό μοντέλο για την πρόβλεψη της ανακτώμενης συγκέντρωσης εκχυλισμένων πρωτεϊνών με βάση την πίεση επεξεργασίας (P), την θερμοκρασία (T) και τον χρόνο εκχύλισης (t). Στόχος ήταν η εξαγωγή ενός συνολικού μοντέλου για την περίπτωση του ενός και των τεσσάρων περασμάτων, ξεχωριστά, το οποίο βασίζεται στο μαθηματικό μοντέλο (9), αλλά οι παράμετροι C_e, C_o και τ , είναι εκφρασμένες ως συναρτήσεις της πίεσης της ομογενοποίησης (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T). Σημειώνεται πως η παράμετρος C_o , αναφέρεται στην απόδοση της εκχύλισης πρωτεϊνών σε χρόνο $t=0$, δηλαδή την στιγμή που το αιώρημα έχει υποστεί την επεξεργασία με (HPH) και έχει ρυθμιστεί το pH=13, πριν από την εκχύλιση. Συνεπώς, η θερμοκρασία εκχύλισης δεν επιδρά σε αυτή την παράμετρο.

4.8.2.1 Συσχέτιση της πίεσης επεξεργασίας (P) και των παραμέτρων του μοντέλου C_e, C_o και τ

Με γνώμονα την καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά αποτελέσματα, οι παράμετροι C_e και τ εκφράστηκαν ως γραμμική συνάρτηση της πίεσης (P) και η παράμετρος C_o ως εκθετική συνάρτηση της πίεσης (P). Έτσι, προέκυψαν δύο σχέσεις της μορφής:

$$y = a \cdot P + b \quad (10)$$

- όπου y οι παράμετροι C_e και τ
 P η πίεση της επεξεργασίας με HPH
 a ο ρυθμός μεταβολής των παραμέτρων C_e και τ με την πίεση
 b οι τιμές C_e και τ που αντιστοιχούν στα ανεπεξέργαστα κύτταρα

και μια σχέση της μορφής:

$$C_o = c \cdot \exp(d \cdot P) \quad (11)$$

- όπου P η πίεση της επεξεργασίας με HPH
 c ο ρυθμός μεταβολής του C_o με την πίεση
 d η τιμή του C_o που αντιστοιχεί στα ανεπεξέργαστα κύτταρα

4.8.2.2 Εξίσωση Arrhenius

Για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας της εκχύλισης στις παραμέτρους της εξίσωσης (10) και άρα εμμέσως για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας της εκχύλισης στις παραμέτρους C_e και τ , και στον ρυθμό μεταβολής των παραμέτρων αυτών με την πίεση, εφαρμόστηκε η εξίσωση Arrhenius.

$$\ln a = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + \ln a_{ref} \quad (12)$$

- όπου a οι παράμετροι της εξίσωσης (10)
 E_a η ενέργεια ενεργοποίησης $\frac{kJ}{mol}$
 R η παγκόσμια σταθερά αερίων ίση με $8.314 \left(\frac{J}{mol \cdot K} \right)$
 T η θερμοκρασία εκχύλισης σε K
 T_{ref} η θερμοκρασία αναφοράς των 40 °C
 a_{ref} η τιμή της παραμέτρου a για $T=40$ °C

και σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα ακολουθώντας την γραμμική τάση.

Από την παραπάνω προσαρμογή υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης E_a , για κάθε μέγεθος στο οποίο εφαρμόστηκε, και εκτιμήθηκε εάν η επίδραση της θερμοκρασίας είναι σημαντική για αυτό το μέγεθος, γνωρίζοντας ότι η επίδραση της είναι σημαντική όταν $E_a > 10 \frac{kJ}{mol}$.

Αντικαθιστώντας στην σχέση (9) τις σχέσεις που έχουν προκύψει για $C_e = f(P, T)$, $C_o = f(P)$ και $\tau = f(P, T)$, προκύπτει μια συνολική συνάρτηση για το ένα πέρασμα και μια συνολική σχέση για τα τέσσερα περάσματα, όπου η ανακτώμενη συγκέντρωση των εκχυλισμένων πρωτεϊνών είναι συνάρτηση των P, T, t.

4.9 Στατιστική ανάλυση

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 Statistica.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων

5.1 Εισαγωγή

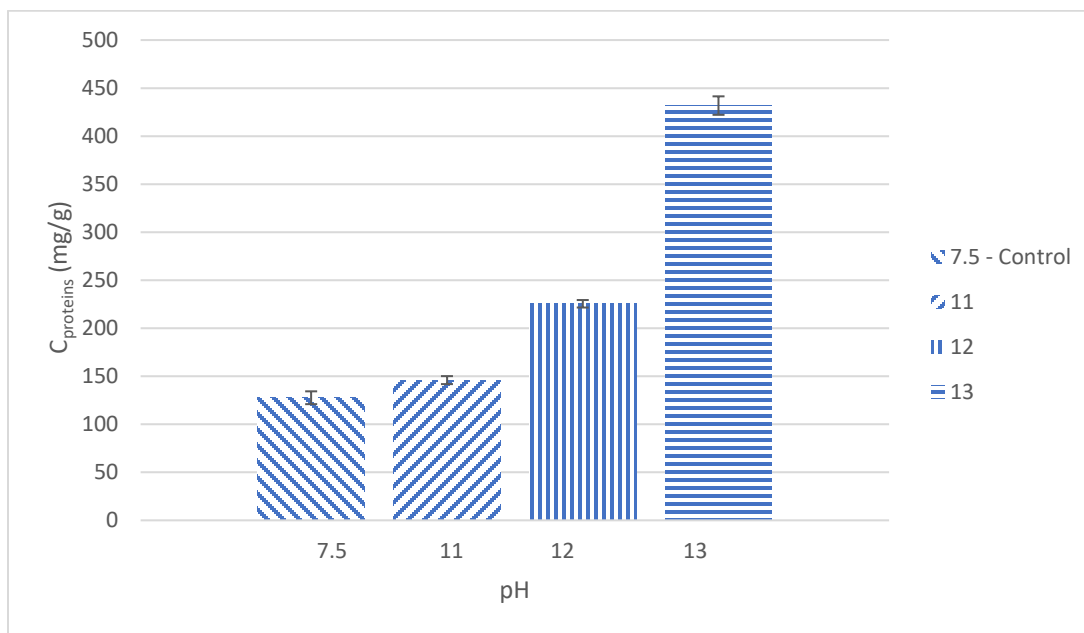
Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη μελέτη της ανάκτησης των πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C. pyrenoidosa*. Αρχικά, σχολιάζεται η ολική περιεκτικότητα του μικροφύκου σε πρωτεΐνες και δικαιολογείται η επιλογή της τιμής pH=13 στην οποία ρυθμίστηκε το pH όλων των δειγμάτων για κάθε συνθήκη επεξεργασίας με HPH (400/1, 400/4, 600/1, 600/4, 800/1 και 800/4) και για το ανεπεξέργαστο δείγμα Control και για κάθε θερμοκρασία εκχύλισης (20°C, 30°C και 40°C). Στην συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μαθηματικής μοντελοποίησης της ανακτώμενης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης, σύμφωνα με την εξίσωση (9) και σχολιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στην τελική απόδοση της εκχύλισης και στον χαρακτηριστικό χρόνο του μοντέλου, τ , και η επίδραση της επεξεργασίας στην ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε χρόνο $t=0$, δηλαδή την στιγμή όπου ρυθμίζεται το pH=13, έπειτα από την επεξεργασία των δειγμάτων με HPH και πριν την εκχύλιση τους στο υδατόλουτρο. Ακολούθως, οι παράμετροι του μοντέλου C_e, C_o και τ , εκφράστηκαν ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας, P, και της θερμοκρασίας εκχύλισης, T, με τη βοήθεια της εξίσωσης Arrhenius (12) και για κάθε μια από τις περιπτώσεις του ενός και των τεσσάρων περασμάτων από τον ομογενοποιητή, προέκυψε ένα μοντέλο πρόβλεψης της απόδοσης ανάκτησης των πρωτεϊνών συναρτήσει της P και της T, το οποίο βασίστηκε στην σχέση (9). Επιπλέον, γνωρίζοντας πως μαζί με τις πρωτεΐνες παραλαμβάνονται και άλλα συστατικά του κυττάρου του μικροφύκου *C. pyrenoidosa*, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες και χλωροφύλλες και στην συνέχεια, με έναν συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν μετά την επεξεργασία των δειγμάτων με HPH, έγινε προσπάθεια παραλαβής, όσο το δυνατόν καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων.

5.2 Χαρακτηρισμός πρώτης ύλης

Η ξηρή βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιείχε ένα σημαντικό ποσοστό πρωτεϊνών. Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα της βιομάζας σε αυτά τα συστατικά έγινε χρήση της τεχνολογίας της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης και στην συνέχεια ρύθμιση του pH=13, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4. Σημειώνεται ότι για την επιλογή του συγκεκριμένου pH, πέρα από την βιβλιογραφική αναζήτηση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές μεταξύ των τιμών 11, 12 και 13, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, αφού είχε γίνει η επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης στα 800 bar για 10 περάσματα, και η τιμή pH=13 επιλέχθηκε ως η πιο αποδοτική ως προς την εκχύλιση των πρωτεϊνών.

Συγκεκριμένα, στο αιώρημα 2.5% w/w *C. pyrenoidosa* εφαρμόστηκε η ακραία συνθήκη επεξεργασίας, στα 800 bar με 10 περάσματα και με εκχύλιση στους 40°C για 24h, η οποία θεωρείται ότι προκαλεί πλήρη διάρρηξη των κυττάρων του μικροφύκου και συνεπώς με την εφαρμογή της επιτυγχάνεται η υψηλότερη ανακτώμενη συγκέντρωση πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα $435.33 \pm 14.43 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ ή $43.5 \pm 1.4\%$, το οποίο θεωρούμε ως το

συνολικό ποσοστό των πρωτεϊνών στα κύτταρα της *C. pyrenoidosa* που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα.



Διάγραμμα 7. Ανάκτηση πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* μετά από επεξεργασία στα 800 bar και με 10 περάσματα με Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης, ρύθμιση του pH και εκχύλιση στους 40 °C για 24 h. Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Παράλληλα, με την μέθοδο που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 4, προσδιορίστηκαν επίσης οι ολικές χλωροφύλλες και οι ολικοί υδατάνθρακες που εντοπίζονται στην πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα, καθώς το ποσοστό αυτών των συστατικών στο κύτταρο του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* είναι σημαντικό.

Οι ολικές περιεκτικότητες πρωτεϊνών, υδατανθράκων και χλωροφυλλών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Μέγιστες ανακτημένες πρωτεΐνες, μέγιστοι ανακτημένοι υδατάνθρακες και μέγιστες ανακτημένες χλωροφύλλες πρώτης ύλης

Ολικές πρωτεΐνες	$435.33 \pm 14.43 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$
Ολικοί υδατάνθρακες	$158.5 \pm 9.4 \frac{\text{mg υδατανθράκων}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$
Ολικές χλωροφύλλες	$18.45 \pm 0.89 \frac{\text{mg χλωροφυλλών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$

5.2.1 Πρωτεΐνες

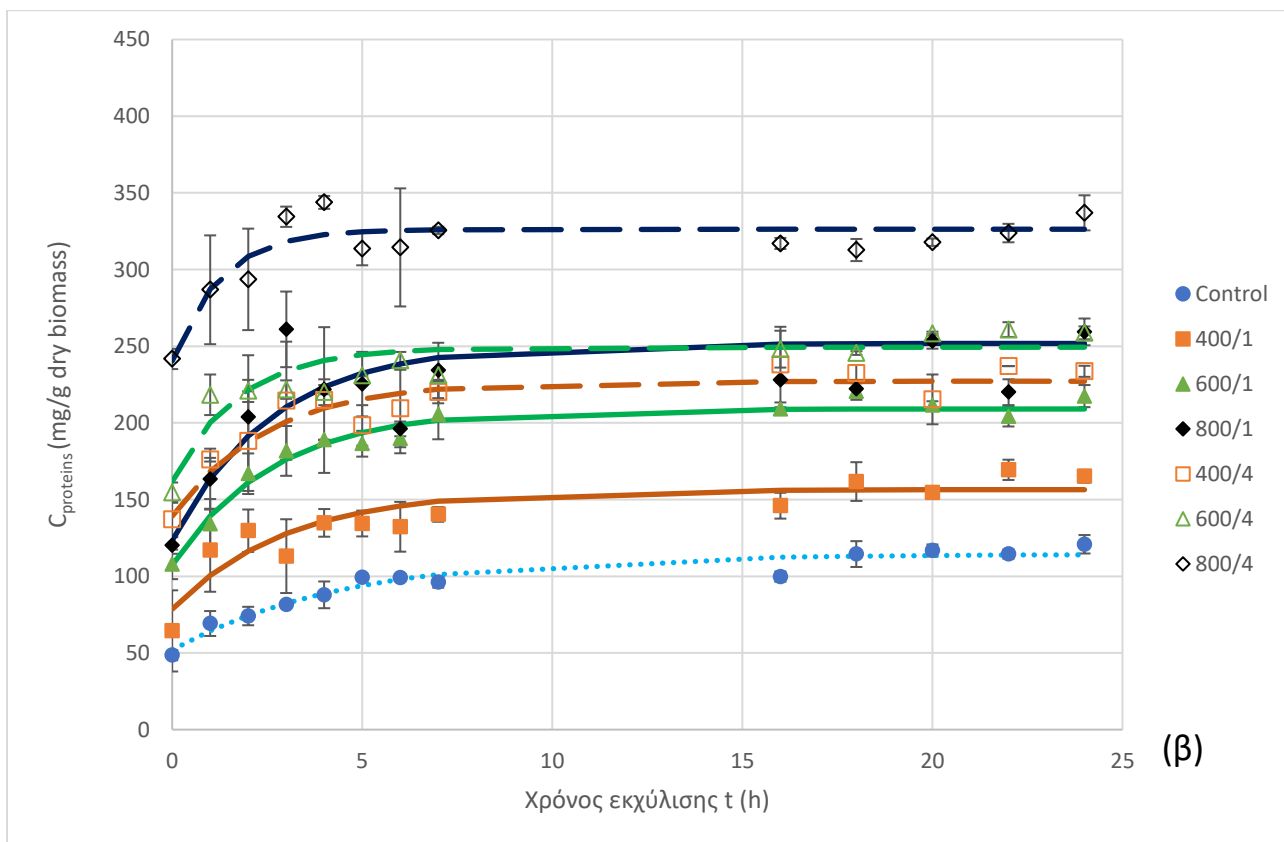
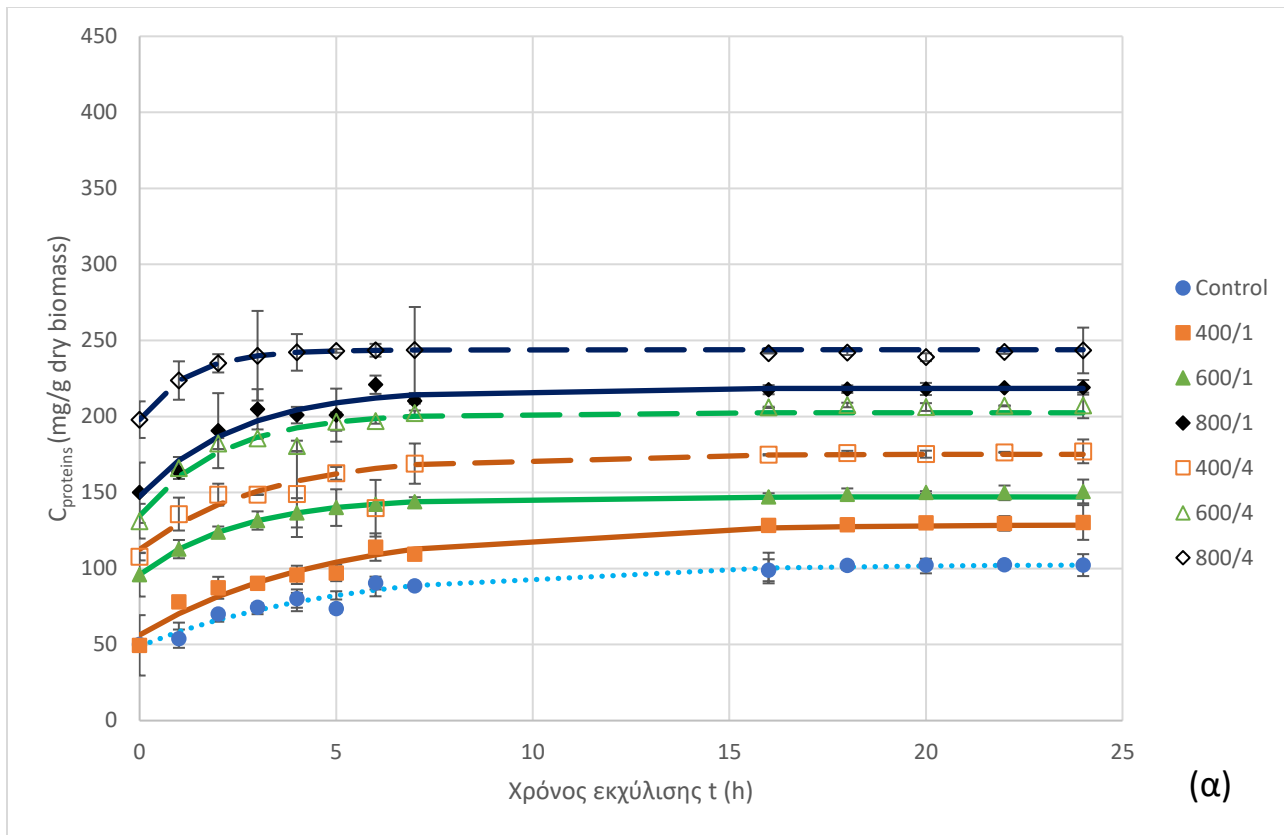
Για την μελέτη της κινητικής ανάκτησης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο (9)

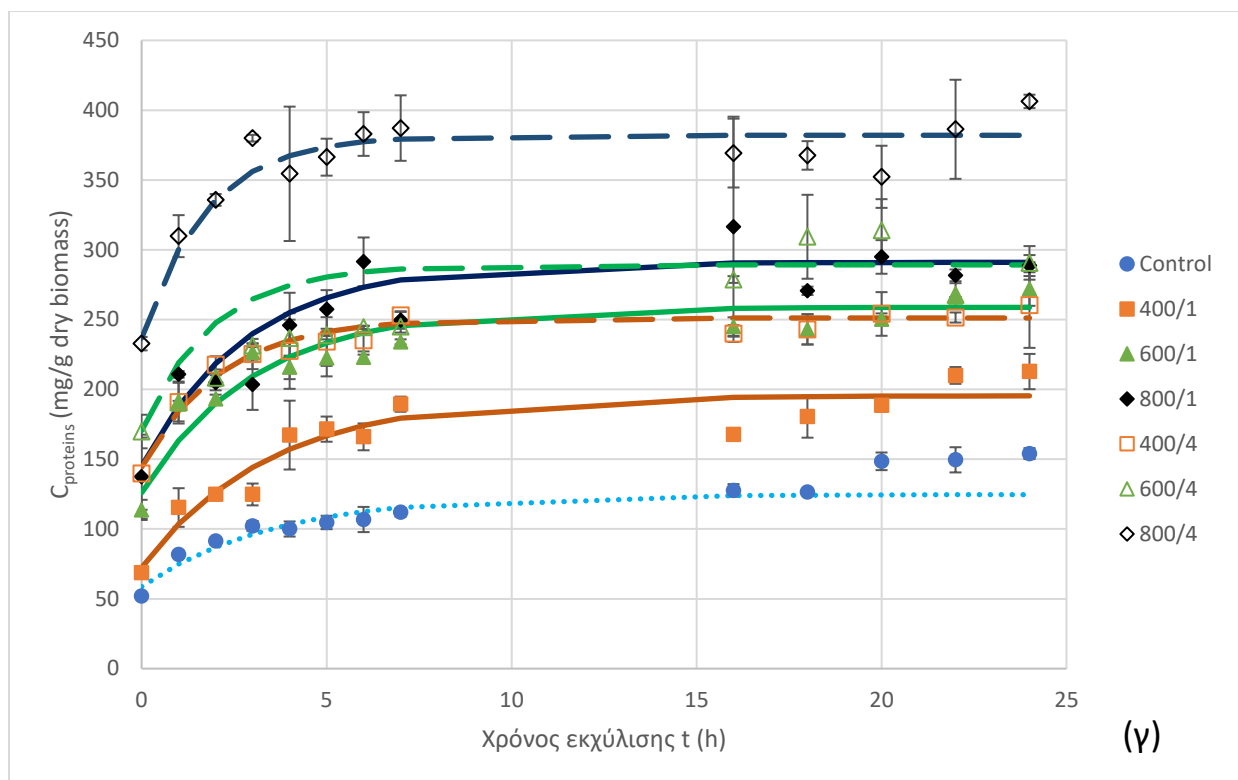
$$C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

Ως C_e ορίζεται η τελικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε χρόνο $t \rightarrow \infty$, ως C_0 η αρχικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών για $t = 0$ και ως τ θεωρείται ο χαρακτηριστικός χρόνος εκχύλισης κατά τον οποίο έχει επιτευχθεί το 63.3% του φαινομένου της εκχύλισης. Ως C ορίζεται η ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών εκφρασμένο σε mg ανακτημένων πρωτεϊνών/ g βιομάζας. Το μοντέλο αυτό επιλέχθηκε τόσο λόγω της ικανοποιητικής του προσαρμογή στα πειραματικά σημεία ($R^2 > 0.9$), όσο λόγω των εύχρηστων παραμέτρων του, από τις οποίες μπορεί να γίνει κατανοητή η εξέλιξη της εκχύλισης σε κάθε χρονική στιγμή. Επιπλέον, χρησιμοποιείται βιβλιογραφικά για την παραλαβή ενδοκυτταρικών συστατικών. (Dimopoulos, Limnaios et al., 2021)

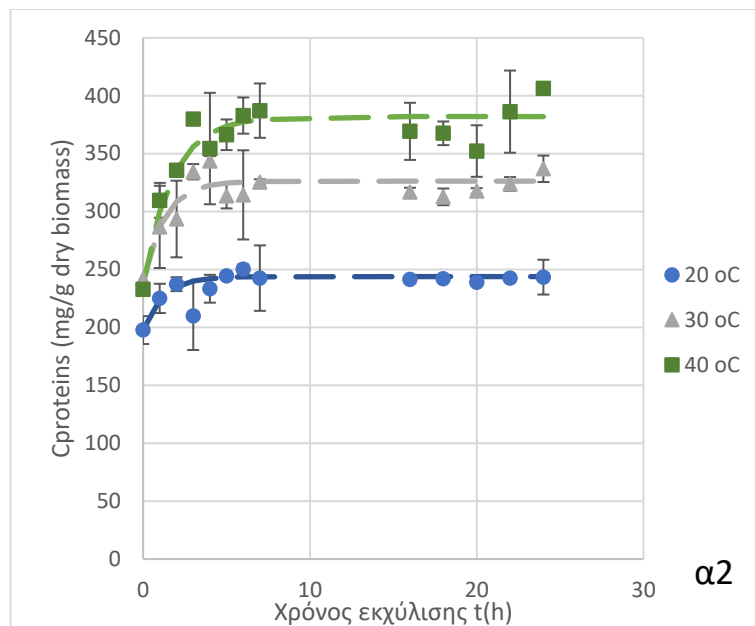
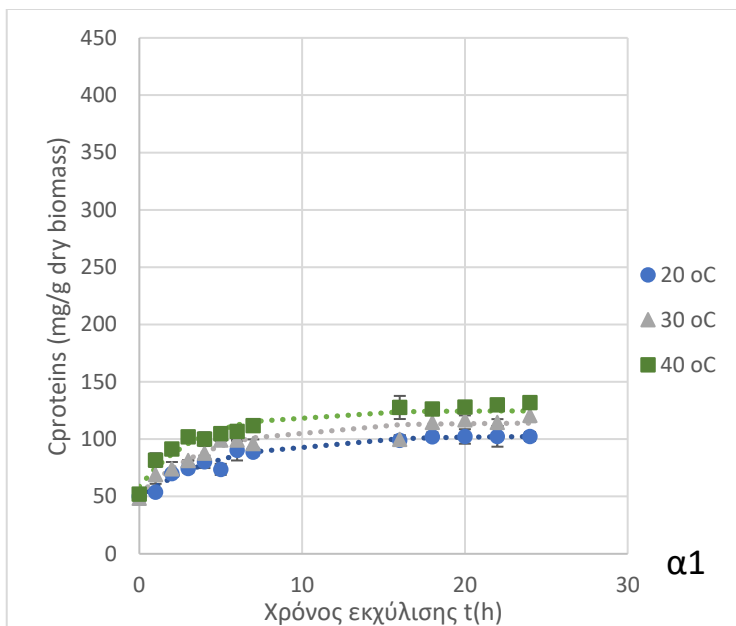
5.2.1.1 Μελέτη της κινητικής ανάκτησης των πρωτεϊνών

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα των πρωτογενών δεδομένων που περιγράφουν την εξέλιξη της εκχύλισης για κάθε συνθήκη επεξεργασίας με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης και για κάθε θερμοκρασία εκχύλισης.





Διάγραμμα 8. Ανάκτηση των πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. rygenoidosa* όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα (σημεία) και όπως περιγράφηκε μαθηματικά σύμφωνα με το μοντέλο $C=C_e-(C_o-C_e)*\exp(-t/\tau)$ (γραμμές με τελείες: ανεπεξεργαστο δείγμα, συνεχείς γραμμές: επεξεργασμένα δείγματα με ένα πέρασμα, διακεκομμένες γραμμές: επεξεργασμένα δείγματα με τέσσερα περάσματα) για θερμοκρασία εκχύλισης 20 °C (α), 30 °C(β) 40°C (γ). Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.



Διάγραμμα 9. Ανάκτηση των πρωτεϊνών για τις τρεις θερμοκρασίες εκχύλισης (20 °C, 30 °C και 40°C) για το ανεπεξέργαστο δείγμα (α1) και για το δείγμα που υπέστη την επεξεργασία 800/4 (α2) όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα (σημεία) και όπως περιγράφηκε μαθηματικά σύμφωνα με το μοντέλο $C=C_e - (C_e - C_0) \cdot \exp(-t/\tau)$ (καμπύλες). Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα, η προκατεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, ευνοεί σημαντικά την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών για οποιαδήποτε θερμοκρασία εκχύλισης, αφού προκαλεί έντονη διάρρηξη του κυττάρου και των ενδοκυτταρικών οργανιδίων. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας το ανεπεξέργαστο δείγμα Control με το ηπιότερα επεξεργασμένο δείγμα, δηλαδή το δείγμα 400/1 και με το εντονότερα επεξεργασμένο δείγμα, δηλαδή το δείγμα 800/4 για τον χρόνο εκχύλισης $t=24\text{h}$, παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση από $102.4 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ σε $130.3 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ και σε $243.4 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$, αντίστοιχα, για θερμοκρασία εκχύλισης $T = 20^\circ\text{C}$. Αντίστοιχα, για θερμοκρασία εκχύλισης $T = 30^\circ\text{C}$, το ανεπεξέργαστο δείγμα Control οδήγησε σε ανακτημένη συγκέντρωση $120.9 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$, το δείγμα 400/1 $165.2 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ και το δείγμα 800/4 $337.0 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$. Τέλος, για θερμοκρασία εκχύλισης $T = 40^\circ\text{C}$, το ανεπεξέργαστο δείγμα Control έχει ανακτημένη συγκέντρωση $154.0 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$, το δείγμα 400/1 $212.8 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ και το δείγμα 800/4 $406.3 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$. Συνολικά, παρατηρείται ότι η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης επιδρά σημαντικά στην απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών. Ωστόσο, σημαντική επίδραση στη διεργασία της εκχύλισης εμφανίζει και η θερμοκρασία εκχύλισης, με την αύξηση της από τους 20°C στους 40°C να επιφέρει σημαντική αύξηση των αποδόσεων τόσο στην περίπτωση των ανεπεξέργαστων (από $102.4 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ σε $154.0 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$) όσο και σε εκείνη των επεξεργασμένων κυττάρων (από $243.4 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ σε $406.3 \frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}}$ με επεξεργασία 800/4). Η επίδραση της θερμοκρασίας

εκχύλισης οφείλεται στην ταχύτερη και εντονότερη υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος και στην αύξηση της κινητικής ενέργειας των μορίων που συνεπάγεται ταχύτερη μεταφορά συστατικών προς το εξωτερικό του κυττάρου.

Σε αυτό το πλαίσιο, σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η βελτιστοποίηση της εκχύλισης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών προκύπτει για την συνθήκη επεξεργασίας 800/4 και για θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C, γεγονός που επαληθεύεται και από τις παραμέτρους του μαθηματικού μοντέλου που ακολουθούν παρακάτω.

5.2.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στην τελικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, C_e , σύμφωνα με το μοντέλο

Πίνακας 6. Τελικά ανακτώμενη συγκέντρωση των πρωτεϊνών C_e (mg πρωτεϊνών/g ξηρής βιομάζας), όπως έχει προκύψει από τις προσαρμογές στα πειραματικά αποτελέσματα για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Θερμοκρασία εκχύλισης	Control	1 πέρασμα			4 περάσματα		
		P=400 bar	P=600 bar	P=800 bar	P=400 bar	P=600 bar	P=800 bar
T=20°C	102.75 ± 5.16 ^a	128.93 ± 6.36 ^c	147.04 ± 6.93 ^d	218.50 ± 5.55 ⁱ	175.11 ± 5.54 ^f	202.41 ± 4.50 ^{gh}	243.88 ± 3.05 ^k
T=30°C	114.25 ± 2.86 ^b	156.49 ± 5.44 ^e	209.09 ± 4.32 ^h	251.80 ± 5.42 ^{kl}	227.14 ± 5.53 ^j	249.35 ± 4.80 ^k	326.29 ± 5.43 ⁿ
T=40°C	124.67 ± 4.26 ^c	195.52 ± 7.59 ^g	258.80 ± 11.59 ^l	291.05 ± 7.81 ^m	251.16 ± 4.58 ^{kl}	289.13 ± 2.26 ^m	382.00 ± 5.60 ^o

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$), μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψε από το Duncan's test ± τυπική απόκλιση.

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, συμπεραίνεται πως η μέγιστη ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών της ανεπεξεργαστης βιομάζας (Control) παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με όλες τις αποδόσεις των δειγμάτων που έχουν υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία, από την ηπιότερη συνθήκη των 400 bar και 1 περάσματος (400/1) μέχρι την εντονότερη των 800 bar και 4 περασμάτων (800/4). Από αυτή την παρατήρηση, επιβεβαιώνεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου στην διάρρηξη του κυττάρου του μικροφύκου. Μάλιστα, για την θερμοκρασία των 20 °C, συγκρίνοντας το ανεπεξέργαστο δείγμα Control με το εντονότερα επεξεργασμένο (800/4), φαίνεται πως η μέγιστη ανάκτηση εκχυλισμένων πρωτεϊνών αυξήθηκε κατά 236%, ενώ στους 30 °C η αντίστοιχη ανάκτηση αυξήθηκε κατά 286% και στους 40 °C κατά 306%. Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας, κοιτάζοντας κάθε στήλη του πίνακα ξεχωριστά, συμπεραίνεται πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τελικές αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών των δειγμάτων που υπέστησαν την ίδια επεξεργασία αλλά επώαστηκαν σε διαφορετική θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, στο δείγμα Control από τους 20 °C στους 40 °C σημειώθηκε αύξηση 121% των τελικών αποδόσεων ανάκτησης πρωτεϊνών, ενώ στο δείγμα 800/4 η αντίστοιχη αύξηση είναι 156%, δηλαδή διπλάσια από αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί, πως με βάση τον πίνακα, φαίνεται να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων 800/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C, 400/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C, 600/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C και 600/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C. Με αυτή την πληροφορία, συμπεραίνεται πως με ηπιότερες συνθήκες προεπεξεργασίας, δηλαδή είτε χαμηλότερη πίεση επεξεργασίας (400/4), είτε μικρότερο αριθμό περασμάτων (600/1), και με μεγαλύτερη θερμοκρασία εκχύλισης (40 °C) μπορεί να

επιτευχθεί αντίστοιχη τελική ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών και ίσο περίπου με $250.0 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το δείγμα 600/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 20 °C δεν παρουσιάζει, επίσης, σημαντικές διαφορές με το δείγμα 600/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C και το δείγμα 400/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C. Έτσι, και σε αυτή την περίπτωση, με εφαρμογή της ηπιότερης συνθήκης (400/1) και με εκχύλιση στην υψηλότερη θερμοκρασία 40 °C προκύπτει η ίδια μέγιστη ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών με αυτό που επιτυγχάνεται με εντονότερες επεξεργασίες.

5.2.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στην ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, C_o , για χρόνο $t=0$, σύμφωνα με το μοντέλο

Πίνακας 7. Ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, C_o (mg πρωτεϊνών/g ξηρής βιομάζας), για χρόνο $t=0$, όπως έχει προκύψει από τις προσαρμογές στα πειραματικά αποτελέσματα για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Control	1 πέρασμα		4 περάσματα	
53.19 ± 4.98^a	P=400 bar	69.07 ± 11.5^a	P=400 bar	132.0 ± 17.0^c
	P=600 bar	109.8 ± 15.1^b	P=600 bar	155.6 ± 18.7^c
	P=800 bar	138.7 ± 13.3^{cd}	P=800 bar	225.0 ± 23.6^e

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$), μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψε από το Duncan's test \pm τυπική απόκλιση.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, έχει πραγματοποιηθεί συσχέτιση της αρχικής ανακτημένης συγκέντρωσης πρωτεϊνών μόνο με την πίεση επεξεργασίας και τον αριθμό των περασμάτων, και όχι με την θερμοκρασία εκχύλισης. Αυτό έγινε καθώς ως αρχικά ανακτημένη συγκέντρωση C_o θεωρείται η ανάκτηση σε χρόνο 0, δηλαδή την στιγμή που έχει ολοκληρωθεί η επεξεργασία του δείγματος με HPH και έχει ρυθμιστεί το pH=13, πριν ξεκινήσει η εκχύλιση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο. Συγκρίνοντας με το ανεπεξέργαστο δείγμα παρατηρείται ότι υπάρχει σημαντική επίδραση της επεξεργασίας στην αρχική απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών, εκτός από την περίπτωση που το δείγμα υπέστη HPH στα 400 bar και με 1 πέρασμα. Μάλιστα, εντοπίζεται αύξηση 423% στην αρχική απόδοση ανάκτησης, μεταξύ του ανεπεξέργαστου δείγματος Control και του δείγματος 800/4. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, πως τα δείγματα 800/1, 400/4 και 600/4 δεν διαφέρουν σημαντικά ως προς την αρχική απόδοση ανάκτησης, συνεπάγεται επομένως πως με υψηλότερη πίεση (800 bar) και 1 πέρασμα το αποτέλεσμα είναι ίδιο με αυτό που επιτυγχάνεται όταν εφαρμόζεται χαμηλότερη πίεση (400 ή 600 bar) και 4 περάσματα.

Συνδυάζοντας αυτά τα στατιστικά αποτελέσματα με τα στατιστικά αποτελέσματα για τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών, φαίνεται ότι και από τις δύο αναλύσεις προκύπτει πως οι συνθήκες 800/1 με θερμοκρασία εκχύλισης στους 30 °C, 400/4 με θερμοκρασία εκχύλισης στους 40 °C και 600/1 με θερμοκρασία εκχύλισης στους 40 °C οδηγούν σε παρόμοια αποτελέσματα, τόσο για την αρχική απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών, όσο και για την τελική.

5.2.1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της επεξεργασίας στον χαρακτηριστικό χρόνο τ του μοντέλου

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικός χρόνος τ (h), όπως έχει προκύψει από τις προσαρμογές στα πειραματικά αποτελέσματα για κάθε συνθήκη εκχύλισης

Θερμοκρασία εκχύλισης	Control	1 πέρασμα			4 περάσματα		
		P=400 bar	P=600 bar	P=800 bar	P=400 bar	P=600 bar	P=800 bar
T=20°C	5.16 ± 0.42 ^h	4.64 ± 0.38 ^c	2.51 ± 0.41 ^{bcde}	2.49 ± 0.64 ^{bcde}	3.15 ± 0.34 ^{defg}	2.07 ± 0.51 ^{bcde}	1.22 ± 0.55 ^a
T=30°C	4.47 ± 0.37 ^h	3.00 ± 0.43 ^{efg}	2.65 ± 0.40 ^{cdef}	2.64 ± 0.42 ^{cdef}	2.48 ± 0.25 ^{bcde}	1.73 ± 0.52 ^{ab}	1.27 ± 0.46 ^a
T=40°C	3.16 ± 0.34 ^g	3.04 ± 0.39 ^{fg}	2.63 ± 0.29 ^{efg}	2.46 ± 0.30 ^{defg}	1.70 ± 0.36 ^{bcd}	1.50 ± 0.14 ^{abc}	1.34 ± 0.37 ^a

Τα γράμματα που παρουσιάζονται ως εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$), μεταξύ των μέσων τιμών, όπως προέκυψε από το Duncan's test ± τυπική απόκλιση.

Όπως φαίνεται, από τον παραπάνω πίνακα, η παράμετρος τ έχει μια τάση μείωσης όσο αυξάνεται η ένταση της επεξεργασίας, αποτέλεσμα το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως με εντονότερες επεξεργασίες λαμβάνονται συντομότερα μεγαλύτερες αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών. Επίσης, κοιτώντας τις στήλες του παραπάνω πίνακα, δηλαδή τις διάφορες συνθήκες HPH που πραγματοποιήθηκαν στο πείραμα, φαίνεται πως η θερμοκρασία δεν έχει σημαντική επίδραση στην παράμετρο τ , εκτός από την περίπτωση του ανεπεξέργαστου δείγματος Control, όπου παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των 40 °C και των άλλων δύο θερμοκρασιών και του δείγματος 400/1, όπου παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των 20 °C και των άλλων δύο θερμοκρασιών. Ακόμα, αξίζει να παρατηρηθεί ότι, μεταξύ δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία με την ίδια πίεση επεξεργασίας (400 και 600 bar) αλλά με διαφορετικό αριθμό περασμάτων, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία εκχύλισης εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στους χρόνους τ . Από την άλλη, για την πίεση επεξεργασίας των 800 bar παρατηρείται ότι ανεξαρτήτως θερμοκρασίας εκχύλισης παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στους χαρακτηριστικούς χρόνους τ , μεταξύ των δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία με ένα πέρασμα και αυτών που έχουν υποστεί επεξεργασία με τέσσερα περάσματα. Η παραπάνω παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα πως αυξανόμενη της έντασης επεξεργασίας, είτε με αύξηση της πίεσης επεξεργασίας είτε με αύξηση του αριθμού περασμάτων, η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στον χαρακτηριστικό χρόνο τ μειώνεται, ενώ αυξάνεται η επίδραση της επεξεργασίας.

5.2.1.5 Ανακεφαλαίωση

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η υψηλότερη ανάκτηση πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C.pyrenoidosa* επιτυγχάνεται όταν αυτό υπόκειται σε επεξεργασία με HPH στα 800 bar και στα 4 περάσματα (800/4) και εκχύλιση στους 40 °C. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας το ανεπεξέργαστο δείγμα Control με το δείγμα 800/4 στους 40 °C, εντοπίζεται αύξηση της τελικά ανακτημένης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών κατά 306%. Αξίζει να σημειωθεί πως η σημαντικά αυξημένη τελική ανάκτηση των πρωτεϊνών μεταξύ του ανεπεξέργαστου δείγματος και του δείγματος που υπέστη την επεξεργασία 800/4, δεν οφείλεται μόνο στην επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης αλλά και στην θερμοκρασία εκχύλισης καθώς με την αύξηση της από τους 20°C στους 40°C παρατηρείται σημαντική αύξηση των τελικών αποδόσεων και

συγκεκριμένα κατά 121% για το δείγμα Control και κατά 156% για το δείγμα 800/4. Επίσης, παρατηρήθηκε πως είναι εφικτό με επεξεργασία με ηπιότερες συνθήκες (χαμηλότερη πίεση επεξεργασίας ή μικρότερος αριθμός περασμάτων) και μεγαλύτερη θερμοκρασία εκχύλισης να επιτευχθεί αντίστοιχη τελικά ανακτημένη συγκέντρωση με αυτή που προκύπτει από επεξεργασία με εντονότερες συνθήκες και μικρότερη θερμοκρασία εκχύλισης. Συγκεκριμένα μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των συνθηκών 400/1 με εκχύλιση στους 40°C, 600/1 με εκχύλιση στους 30°C και 600/4 με εκχύλιση στους 20°C και αντίστοιχα μεταξύ των συνθηκών 800/1 με εκχύλιση στους 30°C, 600/1 με εκχύλιση στους 40°C, 600/4 με εκχύλιση στους 30°C και 400/4 με εκχύλιση στους 40°C. Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως η αρχικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών της συνθήκης 800/4 έχει την τιμή $C_o = 225.0 \pm 23.6 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ ενώ η τελικά ανακτημένη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του ανεπεξέργαστου δείγματος (Control) στην υψηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης (40°C) έχει την τιμή $C_e = 124.67 \pm 4.26 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$. Συμπεραίνεται επομένως ότι η συνθήκη 800/4 είναι τόσο αποδοτική που ακόμα και σε χρόνο $t=0$ επιτυγχάνεται σχεδόν διπλάσια απόδοση από αυτή που επιτυγχάνεται στο δείγμα Control με 24h εκχύλιση στους 40°C.

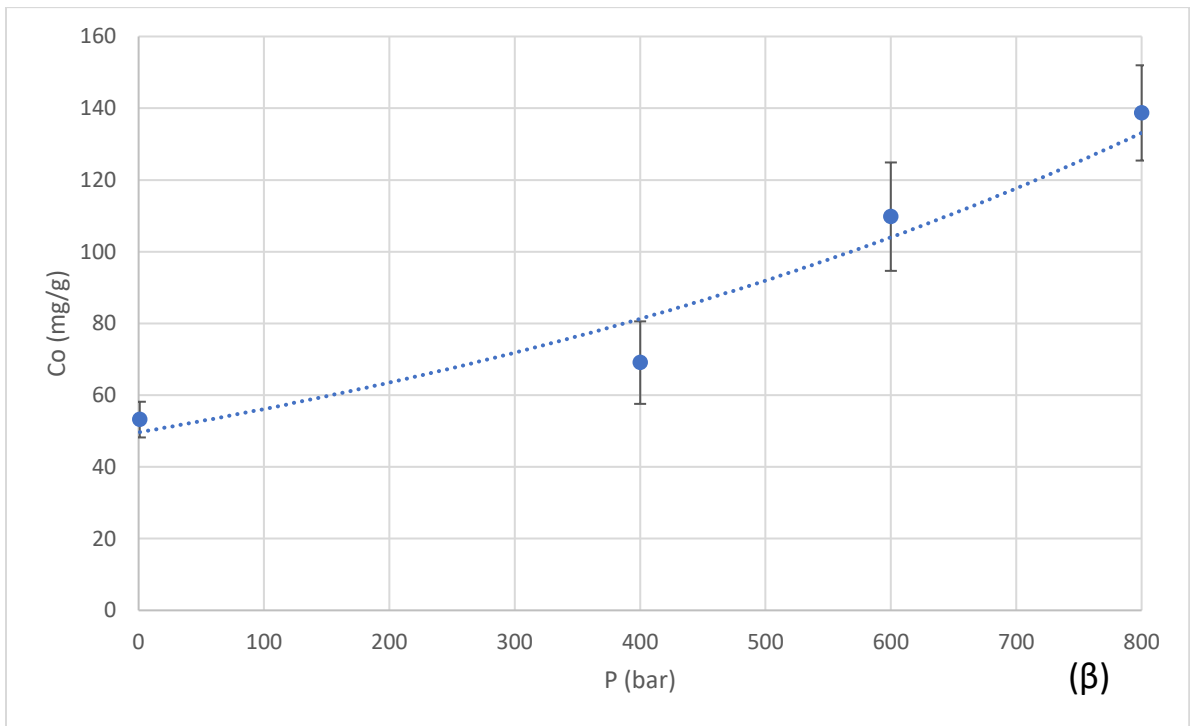
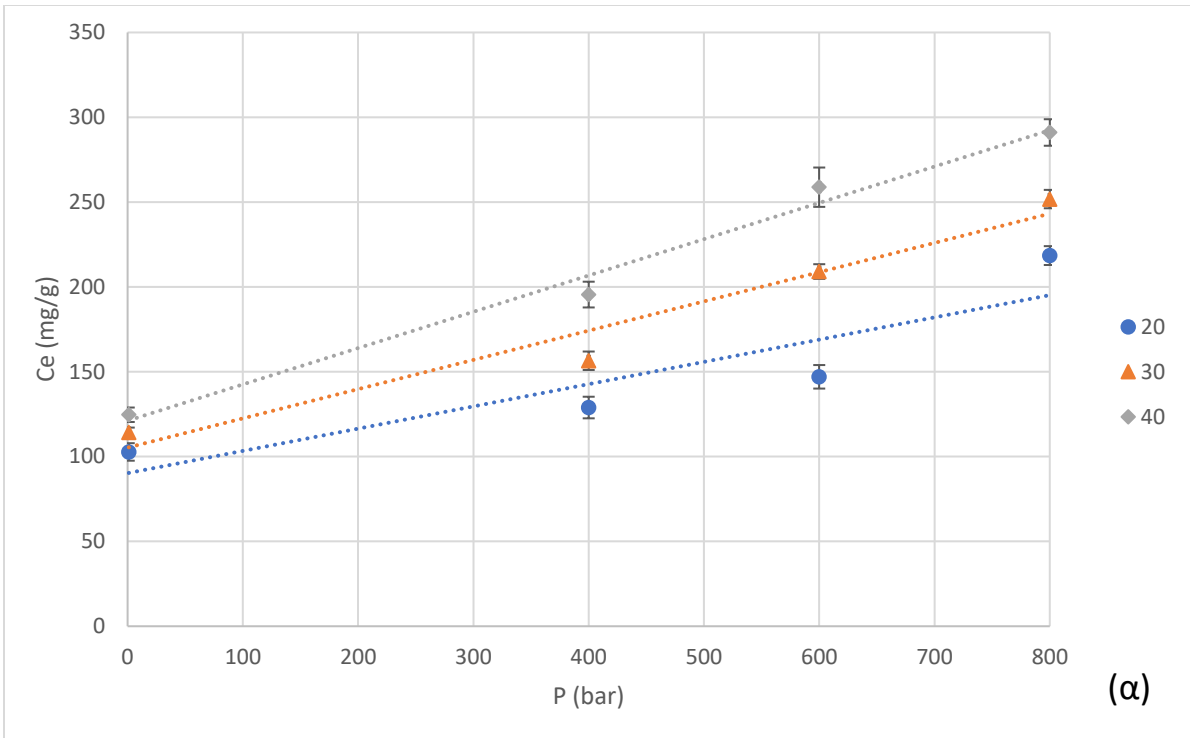
5.2.1.6 Εξαγωγή συνολικού μοντέλου πρόβλεψης της ανακτημένης συγκέντρωσης από την πίεση της επεξεργασίας, τον χρόνο εκχύλισης και την θερμοκρασία εκχύλισης

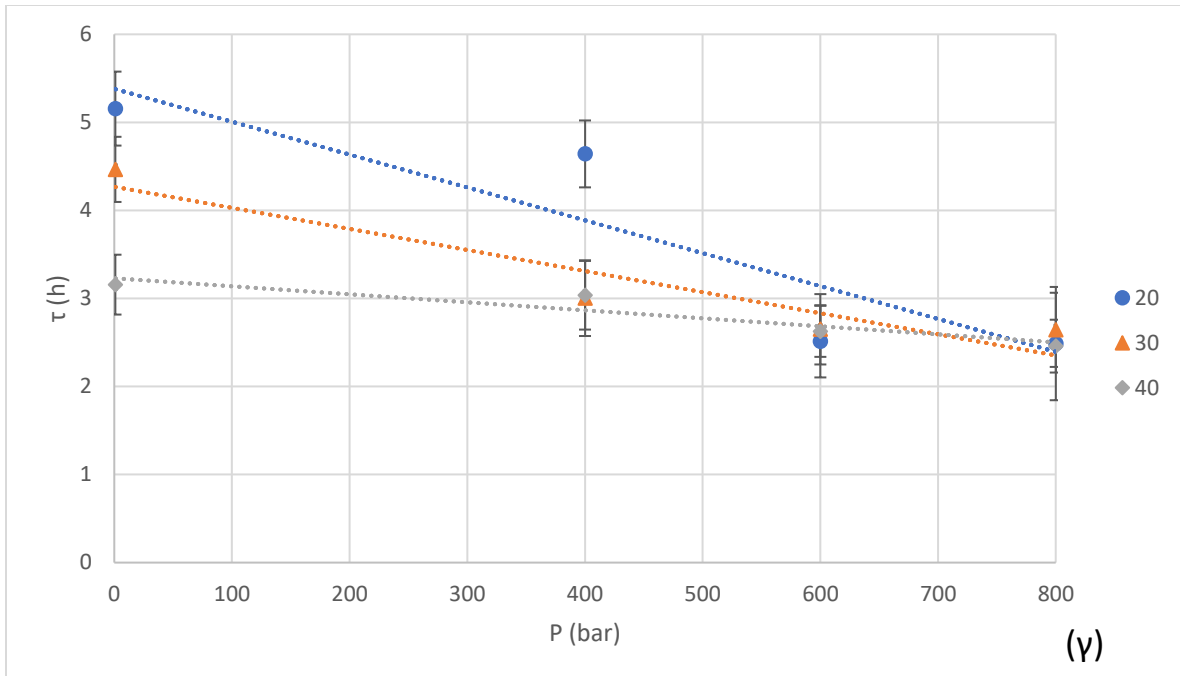
Οι παράμετροι του μοντέλου C_e , C_o και t συσχετίστηκαν με τις μεταβλητές του πειράματος P και T, για το 1 και τα 4 περάσματα ξεχωριστά, ώστε να προκύψει ένα συνολικό μοντέλο πρόβλεψης της ανακτώμενης συγκέντρωσης πρωτεϊνών με μεταβλητές την θερμοκρασία εκχύλισης T, την πίεση στον ομογενοποιητή P και τον χρόνο εκχύλισης t.

5.2.1.6.1 Επεξεργασία με ένα (1) πέρασμα

Αρχικά οι παράμετροι C_e , C_o και t συσχετίστηκαν με την πίεση επεξεργασίας (P).

Η παράμετρος C_o , όπως συζητήθηκε δεν έχει εξάρτηση από την θερμοκρασία εκχύλισης, συνεπώς οι τιμές C_o που χρησιμοποιήθηκαν για το διάγραμμα $C_o - P$, αποτελούν έναν μέσο όρο των τιμών αυτής της παραμέτρου, για τις τρεις θερμοκρασίες, που προέκυψαν από την μοντελοποίηση.





Διάγραμμα 10. Συσχέτιση των παραμέτρων του μοντέλου με την πίεση επεξεργασίας για την περίπτωση του I περάσματος: (α) Γραμμική συσχέτιση C_e - P , (β) Εκθετική συσχέτιση C_o - P , (γ) γραμμική συσχέτιση τ - P . Τα σφάλματα προέκυψαν από την προσαρμογή του μαθηματικού μοντέλου στα πειραματικά σημεία.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται πως η αύξηση της πίεσης επεξεργασίας επιφέρει γραμμική αύξηση της τελικής ανακτημένης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, C_e , γραμμική μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου τ και εκθετική αύξηση της ανακτώμενης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε χρόνο $t=0$, C_o .

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις C_e , C_o , $\tau = f(P)$.

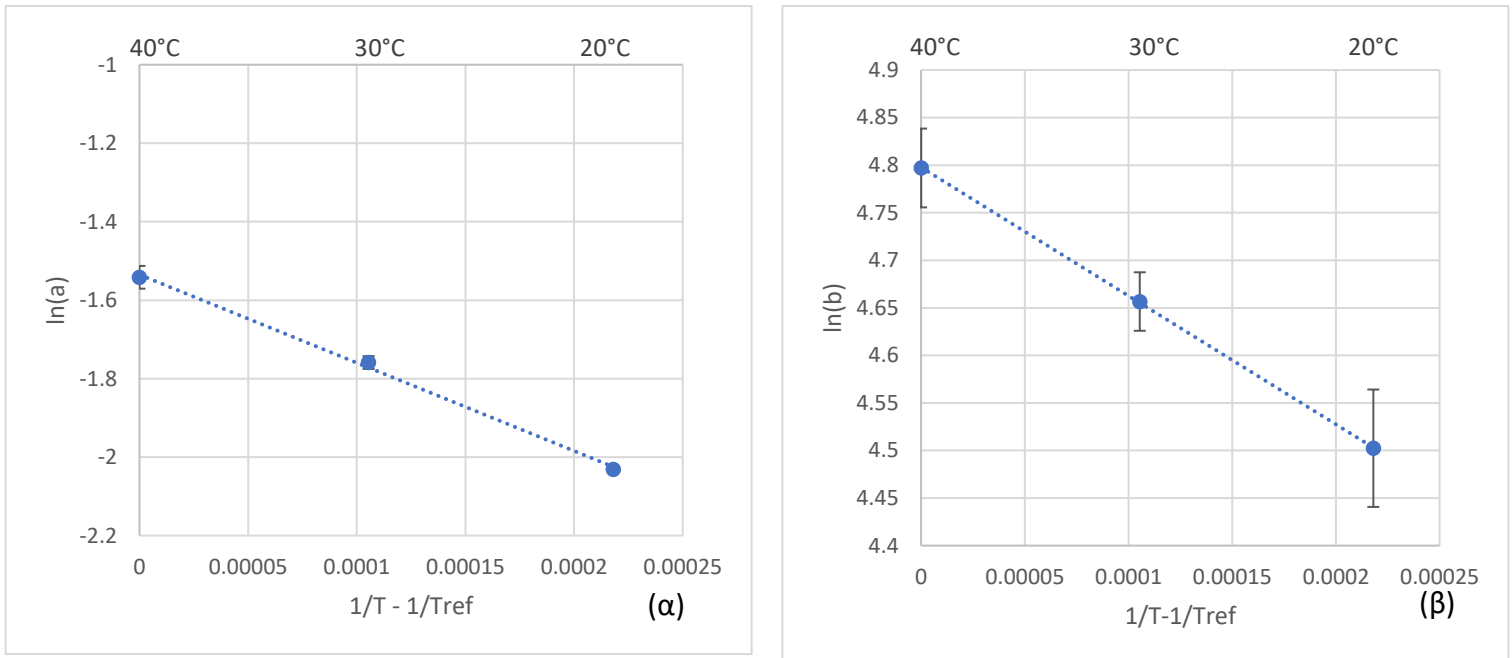
Πίνακας 9. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις C_e , C_o , $\tau = f(P)$ για την περίπτωση του ενός περάσματος

	$T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$	$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$	$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$
$C_e = f(P)$	$0.1312P + 90.234$ $R^2 = 0.8147$	$0.1724P + 105.28$ $R^2 = 0.9570$	$0.2140P + 121.15$ $R^2 = 0.9862$
$C_o = f(P)$	$49.629e^{0.0012P}$ $R^2 = 0.9552$		
$\tau = f(P)$	$-0.0037P + 5.3808$ $R^2 = 0.8267$	$-0.0024P + 4.2687$ $R^2 = 0.8882$	$-0.0009P + 3.2293$ $R^2 = 0.8799$

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της κλίσης και της αποτέμνουσας των γραμμικών σχέσεων $C_e - P$ και $\tau - P$ με την θερμοκρασία χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius (12) και ορίζοντας ως θερμοκρασία αναφοράς τους $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Σημειώνεται πως η αποτέμνουσα των σχέσεων που προέκυψαν μπορεί να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύει τις τιμές των μεγεθών C_e και τ για το

ανεπεξέργαστο δείγμα (Control). Από την άλλη η κλίση τους αντιπροσωπεύει τον ρυθμό μεταβολής των μεγεθών C_e και τ με την αύξηση της πίεσης. Χάριν διευκόλυνσης η κλίση της σχέσης $C_e - P$ ορίζεται ως a και η αποτέμνουσα ως b , δηλαδή $C_e = a \cdot P + b$ και η κλίση της σχέσης $\tau - P$ ορίζεται ως k και η αποτέμνουσα ως m , δηλαδή $\tau = k \cdot P + m$.

Από την προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην κλίση και την αποτέμνουσα των σχέσεων $C_e - P$ και $\tau - P$, λαμβάνεται μια έκφραση των συντελεστών ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης T , $a, b, k, m = f(T)$, ενώ μπορεί να υπολογιστεί και η ενέργεια ενεργοποίησης καθενός από τους συντελεστές.



Διάγραμμα 11. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στις παραμέτρους a (α) και b (β). Τα σφάλματα προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $a, b = f(T)$.

Πίνακας 10. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $a, b = f(T)$.

$\ln(a)$	$-2245.4 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - 1.5351$ $R^2 = 0.9979$
$\ln(b)$	$-1351.2 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + 4.7977$ $R^2 = 0.9999$

Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ότι

$$\ln a = -2245.4 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - 1.5351 \rightarrow$$

$$a = 0.2154 * e^{-2245.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας} * bar} \right)$$

$$\ln b = -1351.2 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + 4.7977 \rightarrow$$

$$b = 121.23 * e^{-1351.2 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$$

Με αντιστοίχιση της σχέσης (12) στις σχέσεις που έχουν προκύψει για τα a και b, μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης του κάθε συντελεστή. Οι ενέργειες ενεργοποίησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 11. Υπολογισμένες ενέργειες ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας (a) και του C_e του δείγματος Control (b). Τα σφάλματα προέκυψαν από γραμμική παλινδρόμηση των συντελεστών a και b.

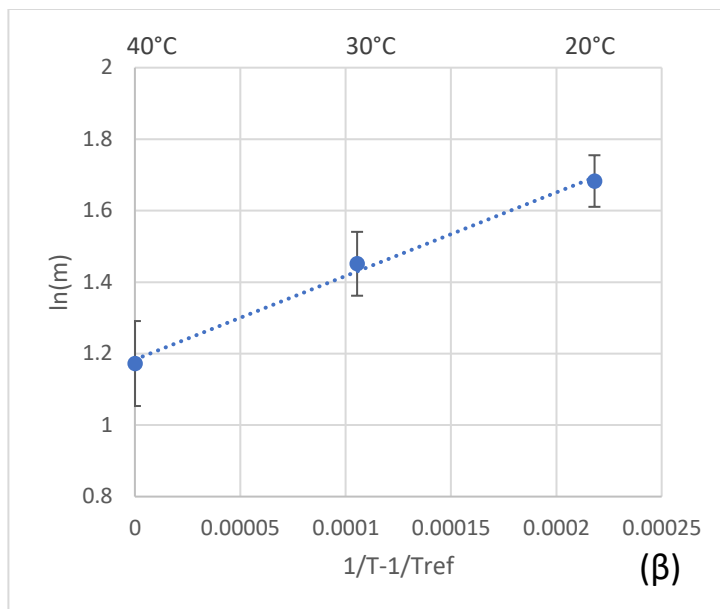
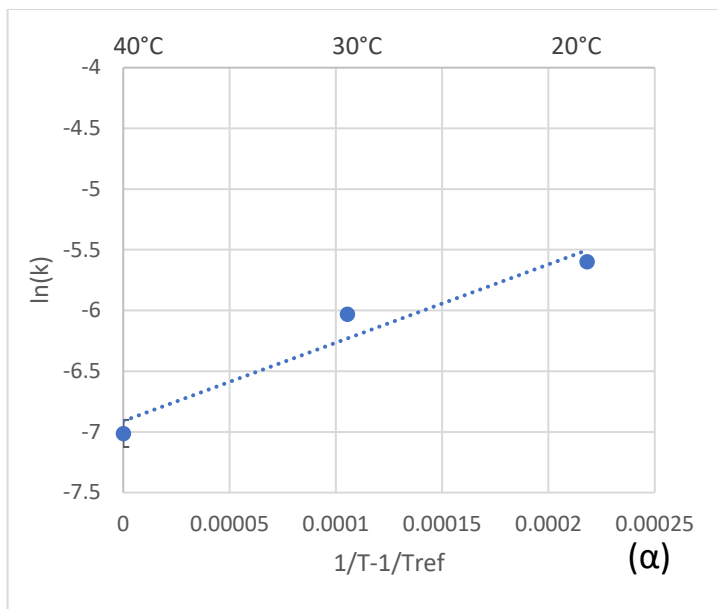
Ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας	$E_{a_a} = 18.67 \pm 0.86 \frac{kJ}{mol}$
Ενέργεια ενεργοποίησης του C_e του δείγματος Control	$E_{a_b} = 9.23 \pm 0.090 \frac{kJ}{mol}$

Παρατηρείται πως η ενέργεια ενεργοποίησης της κλίσης a είναι μεγαλύτερη από την τιμή $10 \frac{kJ}{mol}$, συνεπώς συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση σε αυτή, δηλαδή η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας P. Συγκεκριμένα, επισημαίνεται ότι από τους 20°C στους 40°C ο ρυθμός αύξησης του C_e αυξάνεται σημαντικά κατά 163% και άρα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εκχύλισης η μεταβολή της πίεσης επιφέρει μεγαλύτερη αύξηση του C_e σε σχέση με μικρότερες θερμοκρασίες.

Το αντίθετο ισχύει για τον συντελεστή b, συνεπώς, εφόσον η επίδραση της θερμοκρασίας σε αυτόν δεν είναι σημαντική, μια συνάρτηση αυτού με την θερμοκρασία εκχύλισης δεν έχει νόημα. Έτσι, ο συντελεστής b, δηλαδή η τιμή C_e του δείγματος Control, θεωρείται ίση με τον μέσο όρο των συντελεστών b όπως φαίνονται στον Πίνακα 9, δηλαδή $b = 105.55 \pm 15.46 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$

Συνδυάζοντας τη γραμμική σχέση μεταξύ C_e και P με τις παραπάνω εκφράσεις των συντελεστών ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης, προκύπτει μια συνολική έκφραση για το C_e , για την περίπτωση του 1 περάσματος,

$$C_e = \left(0.2154 * e^{-2245.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 105.55 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$$



Διάγραμμα 12. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στις παραμέτρους k (α) και m (β). Τα σφάλματα προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $k, m = f(T)$.

Πίνακας 12. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $k, m = f(T)$ για την περίπτωση του ενός περάσματος

$\ln(abs(k))$	$6452.4 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - 6.9108$ $R^2 = 0.9439$
$\ln(m)$	$2338 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) + 1.1833$ $R^2 = 0.9947$

Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ότι

$$\ln(abs(k)) = 6452.4 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - 6.9108 \rightarrow k = -0.000997 * e^{6452.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} \left(\frac{h}{bar}\right)$$

$$\ln m = 2338 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) + 1.1833 \rightarrow m = 3.27 * e^{2338 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} (h)$$

Με αντιστοίχιση της σχέσης (12) στις σχέσεις που έχουν προκύψει για τα k και m , μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης του κάθε συντελεστή. Οι ενέργειες ενεργοποίησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 13. Υπολογισμένες ενέργειες ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας (k) και του τ του δείγματος Control (m). Τα σφάλματα προέκυψαν από γραμμική παλινδρόμηση των συντελεστών k και m .

Ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας	$ E_{a_k} = 53.65 \pm 13.08 \frac{kJ}{mol}$
Ενέργεια ενεργοποίησης του τ του δείγματος Control	$ E_{a_m} = 19.44 \pm 1.24 \frac{kJ}{mol}$

Παρατηρείται πως οι ενέργειες ενεργοποίησης και των δύο συντελεστών είναι μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή από την τιμή $10 \frac{kJ}{mol}$, συνεπώς συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση σε αυτές. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό μεταβολής του χαρακτηριστικού χρόνου τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας P και μάλιστα από τους 20°C στους 40°C ο ρυθμός μείωσης του τ μειώνεται κατά 411% και άρα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εκχύλισης η μεταβολή της πίεσης επιφέρει μεγαλύτερη μείωση του τ σε σχέση με μικρότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, από τον Πίνακα 9 φαίνεται πως ο ρυθμός μείωσης του τ στους 40°C είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν στους 20°C και στους 30°C . Από αυτή την παρατήρηση συμπεραίνεται πως στους 40°C η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό είναι σημαντικότερη από την επίδραση της πίεσης.

Από την άλλη, συμπεραίνεται, επίσης, πως και ο χαρακτηριστικός χρόνος τ για το δείγμα Control επηρεάζεται σημαντικά με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Επιπλέον, από τον Πίνακα 9, παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η αποτέμνουσα, δηλαδή το τ του δείγματος Control. Από αυτό συμπεραίνεται πως ο χαρακτηριστικός χρόνος τ μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός αναμενόμενο αφού το τ είναι ένα μέτρο εξέλιξης της εκχύλισης των πρωτεϊνών, και σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός ανάκτησης των πρωτεϊνών αναμένεται να είναι σημαντικά μεγαλύτερος.

Τέλος, από το Διάγραμμα 10γ φαίνεται πως σε υψηλές πιέσεις επεξεργασίας οι τιμές των τ για τις διάφορες θερμοκρασίες τείνουν να ταυτιστούν. Έτσι συμπεραίνεται πως σε υψηλές πιέσεις (<600 bar) η επίδραση της πίεσης στο τ επικαλύπτει την επίδραση της θερμοκρασίας.

Συνδυάζοντας την γραμμική σχέση μεταξύ τ και P με τις παραπάνω εκφράσεις των συντελεστών ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης, προκύπτει μια συνολική έκφραση για το τ , για την περίπτωση του 1 περάσματος.

$$\tau = \left(-0.000997 * e^{6452.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} \right) * P + 3.27 * e^{2338 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} \text{ (h)}$$

Συνολικά, οι παράμετροι του μοντέλου C_e και τ έχουν εκφραστεί ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T) ενώ η παράμετρος C_o έχει εκφραστεί ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P), οπότε για την συνθήκη του 1 περάσματος προκύπτει ένα συνολικό μοντέλο πρόβλεψης της ανακτώμενης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, όπου η συγκέντρωση των ανακτημένων πρωτεϊνών εκφράζεται ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T) ως εξής

$$C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Όπου

$$C_e = \left(0.2154 * e^{-2245.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 105.55 \left(\frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}} \right)$$

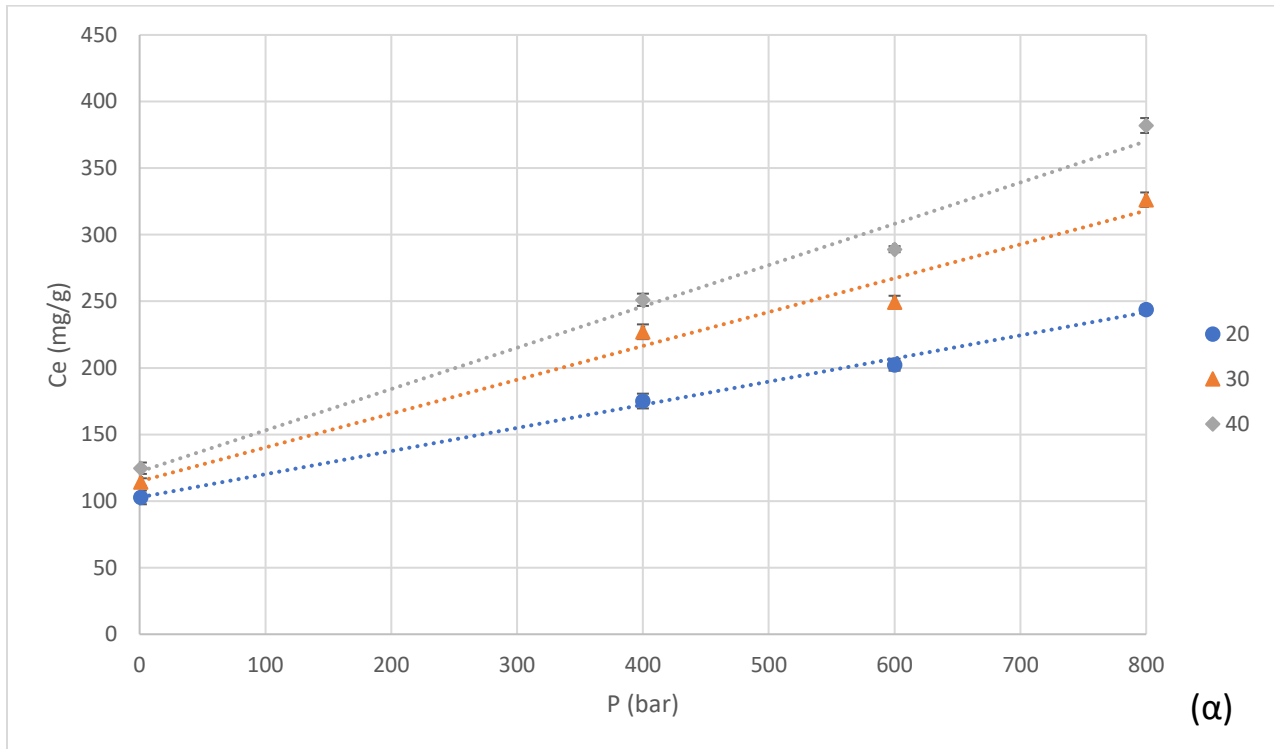
$$C_o = 49.63 * e^{0.0012P} \left(\frac{\text{mg πρωτεϊνών}}{\text{g ξηρής βιομάζας}} \right)$$

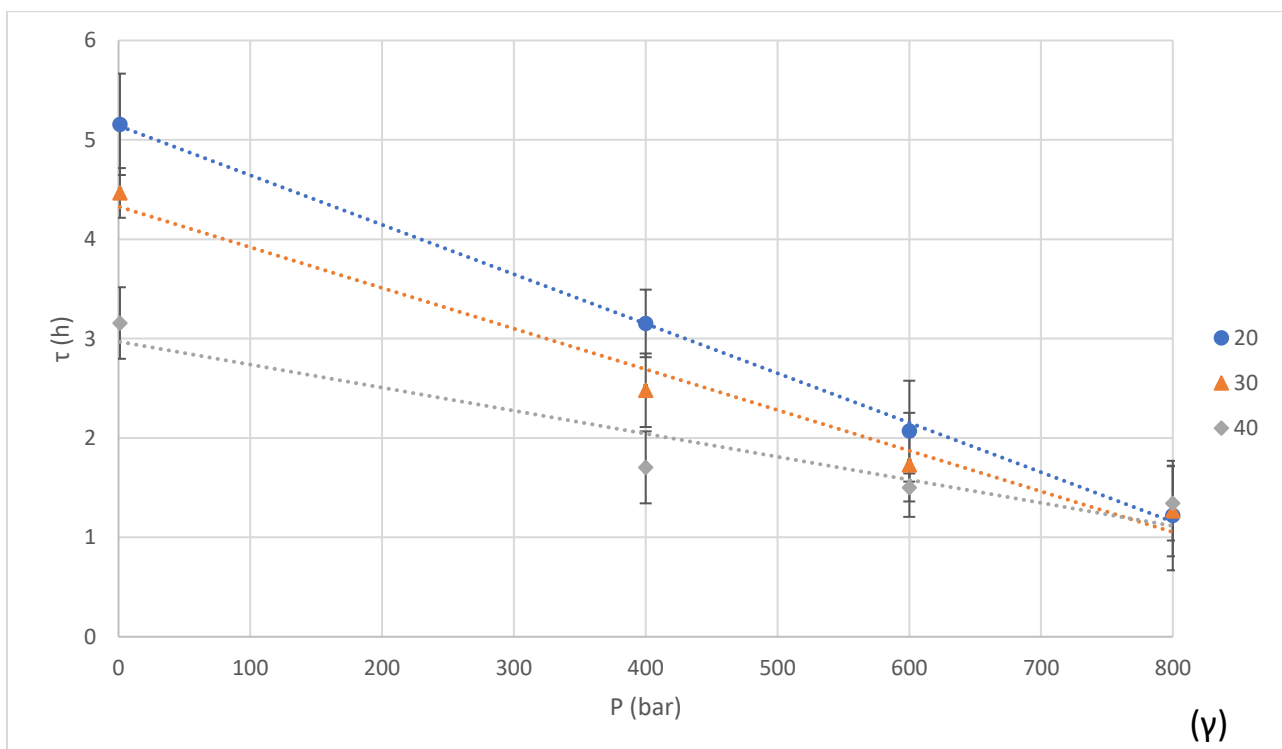
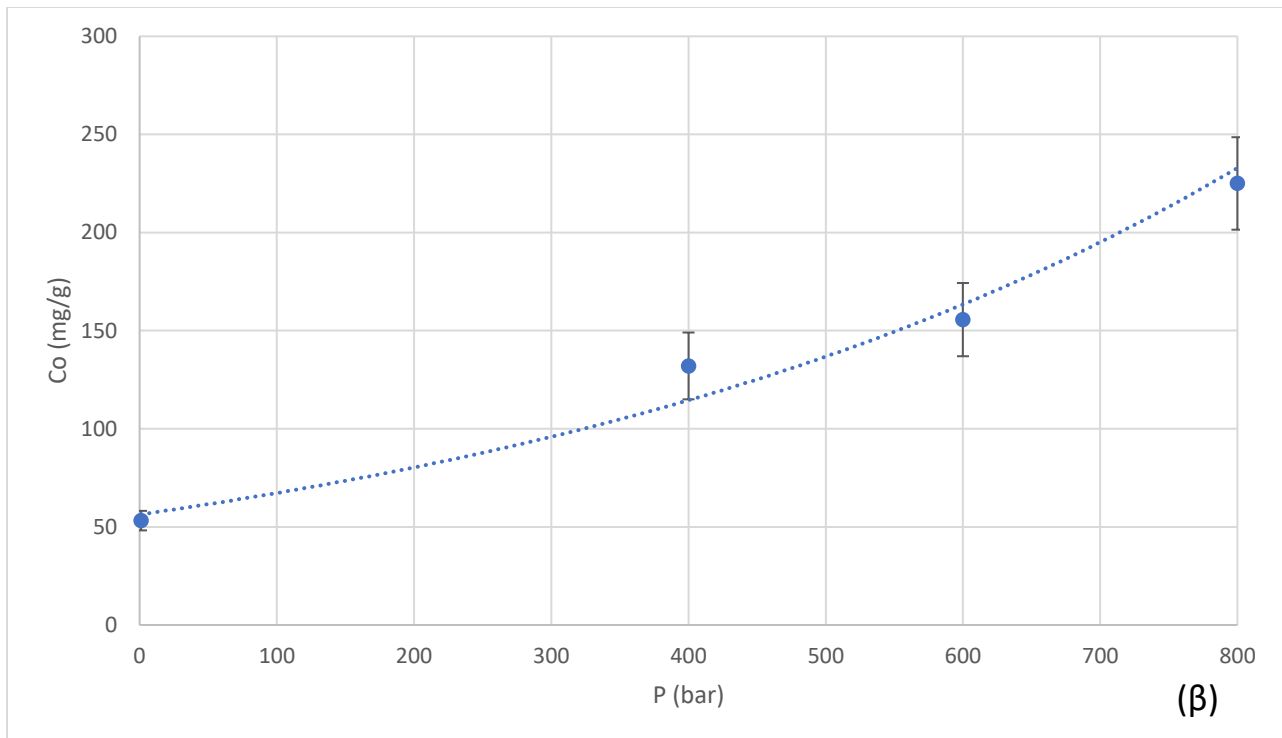
$$\tau = \left(-0.000997 * e^{6452.4 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 3.27 * e^{2338 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \text{ (h)}$$

5.2.1.6.2 Επεξεργασία με τέσσερα (4) περάσματα

Παρόμοια και για την περίπτωση των 4 περασμάτων αρχικά οι παράμετροι C_e , C_o και τ συσχετίστηκαν με την πίεση επεξεργασίας (P).

Όπως και στην περίπτωση του 1 περάσματος, έτσι και για τα 4 περάσματα οι τιμές C_o που χρησιμοποιήθηκαν για το διάγραμμα $C_o - P$, αποτελούν έναν μέσο όρο των τιμών αυτής της παραμέτρου που προέκυψαν από την μοντελοποίηση, για τις τρεις θερμοκρασίες.





Διάγραμμα 13. Συσχέτιση των παραμέτρων του μοντέλου με την πίεση επεξεργασίας για την περίπτωση των 4 περασμάτων: (α) Γραμμική συσχέτιση C_e - P , (β) Εκθετική συσχέτιση C_o - P , (γ) γραμμική συσχέτιση τ - P . Τα σφάλματα προέκυψαν από την προσαρμογή του μαθηματικού μοντέλου στα πειραματικά σημεία.

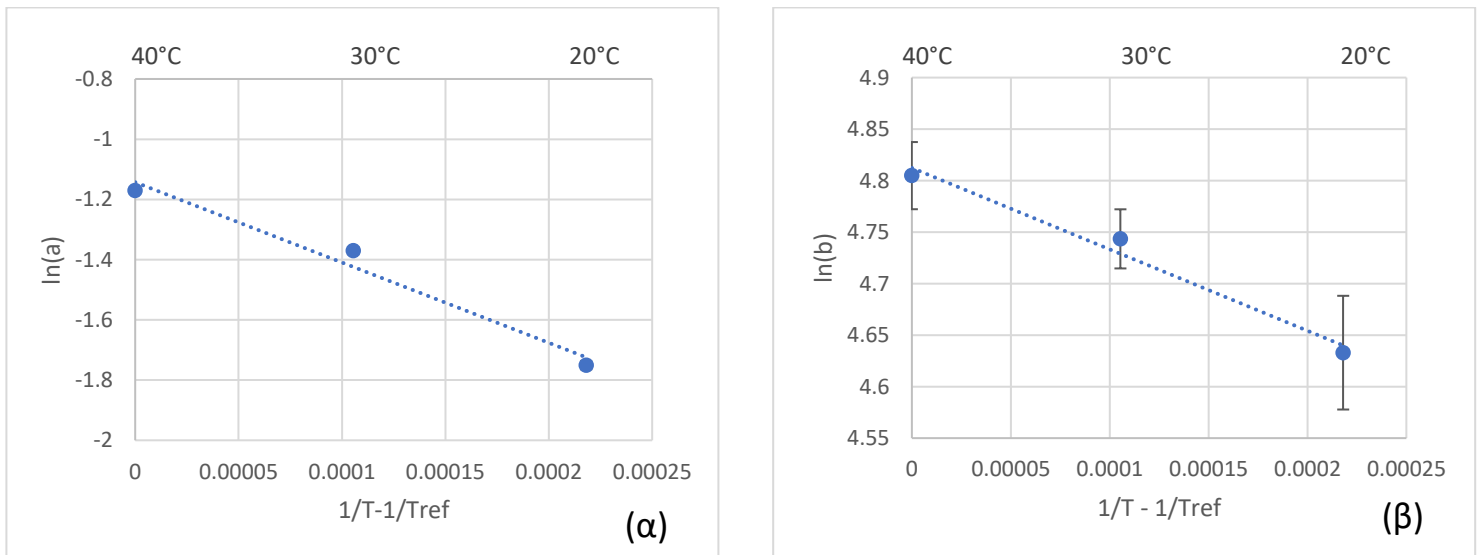
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $C_e, C_o, \tau = f(P)$.

Πίνακας 14. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $C_e, C_o, \tau = f(P)$ για την περίπτωση των τεσσάρων περασμάτων

	$T = 20\text{ }^\circ\text{C}$	$T = 30\text{ }^\circ\text{C}$	$T = 40\text{ }^\circ\text{C}$
$C_e = f(P)$	$0.1737P + 102.82$ $R^2 = 0.9968$	$0.2541P + 114.83$ $R^2 = 0.9782$	$0.3101P + 122.1$ $R^2 = 0.9844$
$C_o = f(P)$	$56.32e^{0.0018P}$ $R^2 = 0.9756$		
$\tau = f(P)$	$-0.005P + 5.1418$ $R^2 = 0.9987$	$-0.0041P + 4.329$ $R^2 = 0.9784$	$-0.0023P + 2.9705$ $R^2 = 0.9005$

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της κλίσης και της αποτέμνουσας των γραμμικών σχέσεων $C_e - P$ και $\tau - P$ με την θερμοκρασία χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius (12) και ορίζοντας ως θερμοκρασία αναφοράς τους $40\text{ }^\circ\text{C}$. Σημειώνεται πως η αποτέμνουσα των σχέσεων που προέκυψαν μπορεί να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύει τις τιμές των μεγεθών C_e και τ για το ανεπεξέργαστο δείγμα (Control). Από την άλλη, η κλίση τους αντιπροσωπεύει τον ρυθμό μεταβολής των μεγεθών C_e και τ με την αύξηση της πίεσης. Χάριν διευκόλυνσης η κλίση της σχέσης $C_e - P$ ορίζεται ως a και η αποτέμνουσα ως b , δηλαδή $C_e = a \cdot P + b$ και η κλίση της σχέσης $\tau - P$ ορίζεται ως k και η αποτέμνουσα ως m , δηλαδή $\tau = k \cdot P + m$.

Από την προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην κλίση και την αποτέμνουσα των σχέσεων $C_e - P$ και $\tau - P$, λαμβάνεται μια έκφραση των συντελεστών ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης T , $a, b, k, m = f(T)$, ενώ μπορεί να υπολογιστεί και η ενέργεια ενεργοποίησης καθενός από τους συντελεστές.



Διάγραμμα 14.. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στις παραμέτρους a (α) και b (β). Τα σφάλματα προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $a, b = f(T)$.

Πίνακας 15. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $a, b = f(T)$ για την περίπτωση των τεσσάρων περασμάτων

$\ln(a)$	$-2665.7 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - 1.143$ $R^2 = 0.9748$
$\ln(b)$	$-790.25 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) + 4.8123$ $R^2 = 0.9793$

Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ότι

$$\ln a = -2665.7 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - 1.143 \rightarrow$$

$$a = 0.3189 * e^{-2665.7 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας} * bar}\right)$$

$$\ln b = -790.25 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) + 4.8123 \rightarrow$$

$$b = 123.01 * e^{-790.25 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195\right)} \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}\right)$$

Με αντιστοίχιση της σχέσης (12) στις σχέσεις που έχουν προκύψει για τα a και b , μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης του κάθε συντελεστή. Οι ενέργειες ενεργοποίησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16. Υπολογισμένες ενέργειες ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας (a) και του C_e του δείγματος Control (b). Τα σφάλματα προέκυψαν από γραμμική παλινδρόμηση των συντελεστών a και b .

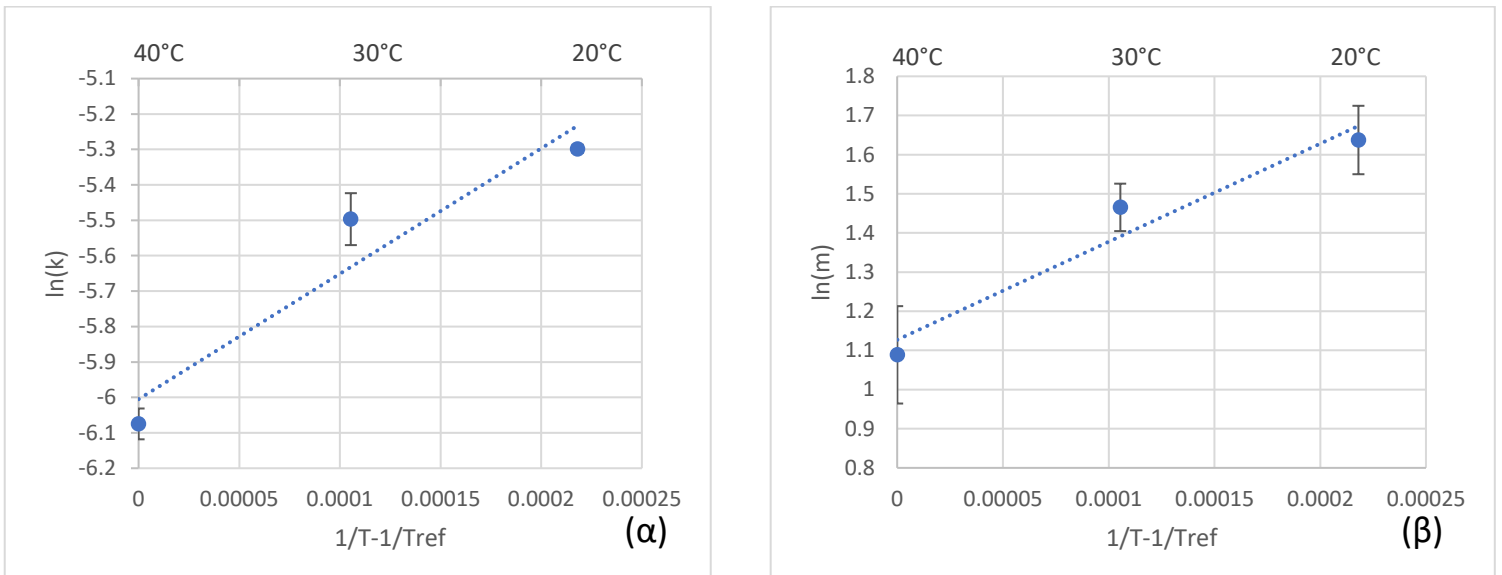
Ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας	$E_{a_a} = 22.16 \pm 3.57 \frac{kJ}{mol}$
Ενέργεια ενεργοποίησης του C_e του δείγματος Control	$E_{a_b} = 6.570 \pm 0.955 \frac{kJ}{mol}$

Παρατηρείται πως η ενέργεια ενεργοποίησης της κλίσης a είναι μεγαλύτερη από την τιμή $10 \frac{kJ}{mol}$, συνεπώς συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση σε αυτή, δηλαδή η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό μεταβολής του C_e με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας P . Συγκεκριμένα, επισημαίνεται ότι από τους $20^\circ C$ στους $40^\circ C$ ο ρυθμός αύξησης του C_e αυξάνεται σημαντικά κατά 179% και άρα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εκχύλισης η μεταβολή της πίεσης επιφέρει μεγαλύτερη αύξηση του C_e σε σχέση με μικρότερες θερμοκρασίες.

Το αντίθετο ισχύει για τον συντελεστή b , συνεπώς, εφόσον η επίδραση της θερμοκρασίας σε αυτόν δεν είναι σημαντική, μια συνάρτηση αυτού με την θερμοκρασία εκχύλισης δεν έχει νόημα. Έτσι, ο συντελεστής b , δηλαδή η τιμή C_e του δείγματος Control, θεωρείται ίση με τον μέσο όρο των συντελεστών b όπως φαίνονται στον Πίνακα 14, δηλαδή $b = 113.25 \pm 9.74 \frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$

Συνδυάζοντας την γραμμική σχέση μεταξύ C_e και P με την παραπάνω έκφραση του συντελεστή a ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης και με την τιμή που υπολογίστηκε για τον συντελεστή b , προκύπτει μια συνολική έκφραση για το C_e , για την περίπτωση των 4 περασμάτων.

$$C_e = \left(0.3189 * e^{-2665.7 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 113.25 \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$$



Διάγραμμα 15. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στις παραμέτρους k (α) και m (β). Τα σφάλματα προέκυψαν από την τυπική απόκλιση των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σχέσεις και τα R^2 που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $k, m = f(T)$.

Πίνακας 17. Σχέσεις που περιγράφουν τις καμπύλες που προσαρμόστηκαν στις συσχετίσεις $k, m = f(T)$ για την περίπτωση του ενός περάσματος

$\ln(abs(k))$	$3540.3 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - 6.0051$ $R^2 = 0.9159$
$\ln(m)$	$2504.7 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + 1.1270$ $R^2 = 0.9476$

Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ότι

$$\ln(ask) = 3540.3 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - 6.0051 \rightarrow k = -0.002446 * e^{3540.3 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \left(\frac{h}{bar} \right)$$

$$\ln m = 2504.7 * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) + 1.1270 \rightarrow m = 3.09 * e^{2504.7 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} (h)$$

Με αντιστοίχιση της σχέσης (10) στις σχέσεις που έχουν προκύψει για τα k και m, μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης του κάθε συντελεστή. Οι ενέργειες ενεργοποίησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18. Υπολογισμένες ενέργειες ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας (k) και του τ του δείγματος Control (m). Τα σφάλματα προέκυψαν από γραμμική παλινδρόμηση των συντελεστών k και m.

Ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού μεταβολής του τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας	$ E_{ak} = 29.43 \pm 8.92 \frac{kJ}{mol}$
Ενέργεια ενεργοποίησης του τ του δείγματος Control	$ E_{am} = 20.82 \pm 2.03 \frac{kJ}{mol}$

Παρατηρείται πως οι ενέργειες ενεργοποίησης και των δύο συντελεστών είναι μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή από την τιμή $10 \frac{kJ}{mol}$, συνεπώς συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση σε αυτές. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό μεταβολής του χαρακτηριστικού χρόνου τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας P και μάλιστα από τους 20°C στους 40°C ο ρυθμός μείωσης του τ μειώνεται κατά 217% και άρα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εκχύλισης η μεταβολή της πίεσης επιφέρει μεγαλύτερη μείωση του τ σε σχέση με μικρότερες θερμοκρασίες. Όπως και στην περίπτωση του ενός περάσματος και εδώ παρατηρείται, σύμφωνα με τον Πίνακα 14, ότι ο ρυθμός μείωσης του τ στους 40 °C είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν στους 20°C και στους 30°C. Από αυτή την παρατήρηση συμπεραίνεται πως στους 40°C η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό είναι σημαντικότερη από την επίδραση της πίεσης. Παρολ' αυτά, παρατηρώντας την τιμή του ρυθμού μείωσης του τ με την αύξηση της πίεσης επεξεργασίας στους 40 °C για την περίπτωση του ενός περάσματος και την περίπτωση των τεσσάρων περασμάτων, φαίνεται ότι η τιμή του στο ένα πέρασμα είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή στα τέσσερα περάσματα. Από αυτή την παρατήρηση προκύπτει ότι, με αύξηση του αριθμού των περασμάτων μειώνεται η επίδραση της θερμοκρασίας σε αυτόν.

Από την άλλη, συμπεραίνεται, επίσης, πως και ο χαρακτηριστικός χρόνος τ για το δείγμα Control επηρεάζεται σημαντικά με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Επιπλέον, από τον Πίνακα 14, παρατηρείται πως με αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η αποτέμνουσα, δηλαδή το τ του δείγματος Control. Από αυτό συμπεραίνεται πως ο χαρακτηριστικός χρόνος τ μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός αναμενόμενο αφού το τ είναι ένα μέτρο εξέλιξης της εκχύλισης των πρωτεϊνών, και σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο αρχικός ρυθμός ανάκτησης των πρωτεϊνών είναι σημαντικά μεγαλύτερος.

Τέλος, από το Διάγραμμα 13γ φαίνεται πως σε υψηλές πιέσεις επεξεργασίας οι τιμές των τ για τις διάφορες θερμοκρασίες τείνουν να ταυτιστούν. Έτσι συμπεραίνεται πως σε υψηλές πιέσεις (<600 bar) η επίδραση της πίεσης στο τ επικαλύπτει την επίδραση της θερμοκρασίας.

Συνδυάζοντας την γραμμική σχέση μεταξύ τ και P με τις παραπάνω εκφράσεις των συντελεστών ως προς την θερμοκρασία εκχύλισης, προκύπτει μια συνολική έκφραση για το τ , για την περίπτωση των 4 περασμάτων.

$$\tau = \left(-0.002446 * e^{3540.3 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 3.42 * e^{1932.0 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \quad (h)$$

Συνολικά, οι παράμετροι του μοντέλου C_e και τ έχουν εκφραστεί ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T) ενώ η παράμετρος C_o έχει εκφραστεί ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P), οπότε για την συνθήκη των 4 περασμάτων προκύπτει ένα συνολικό μοντέλο πρόβλεψης της ανακτώμενης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, όπου η συγκέντρωση των ανακτημένων πρωτεϊνών εκφράζεται ως συνάρτηση της πίεσης επεξεργασίας (P) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (T) ως εξής

$$C = C_e - (C_e - C_o) * e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Όπου

$$C_e = \left(0.3189 * e^{-2665.7 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 113.25 \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$$

$$C_o = 56.32 * e^{0.0018P} \left(\frac{mg \text{ πρωτεϊνών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$$

$$\tau = \left(-0.002446 * e^{3540.3 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \right) * P + 3.09 * e^{2504.7 * \left(\frac{1}{T} - 0.003195 \right)} \quad (h)$$

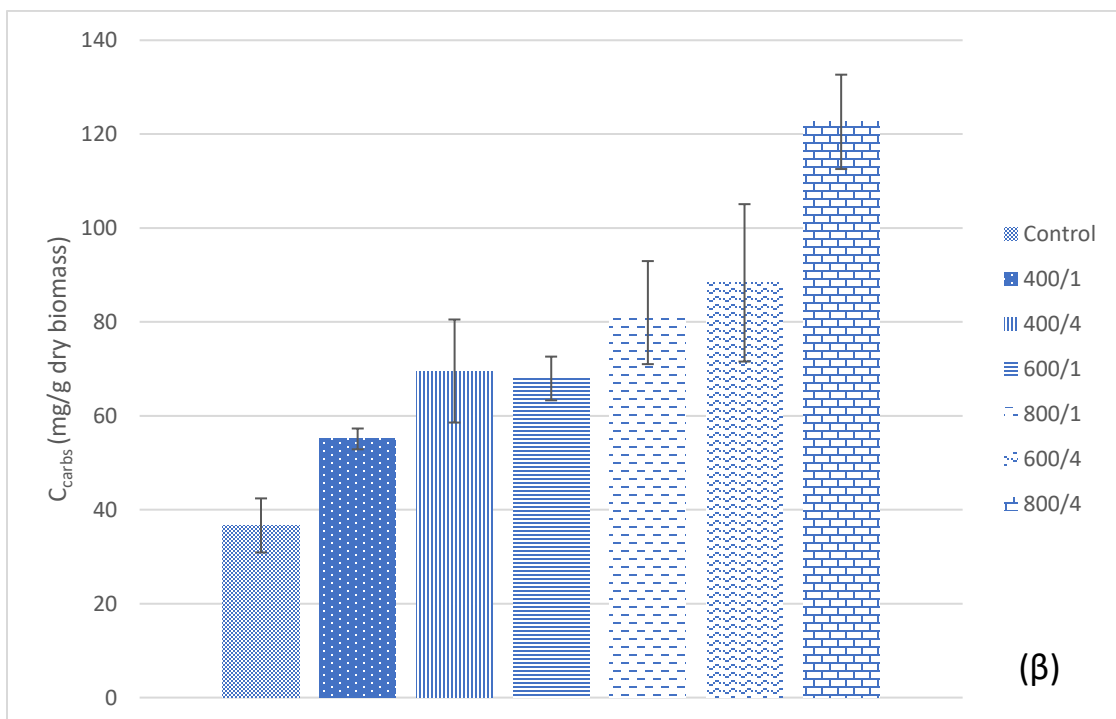
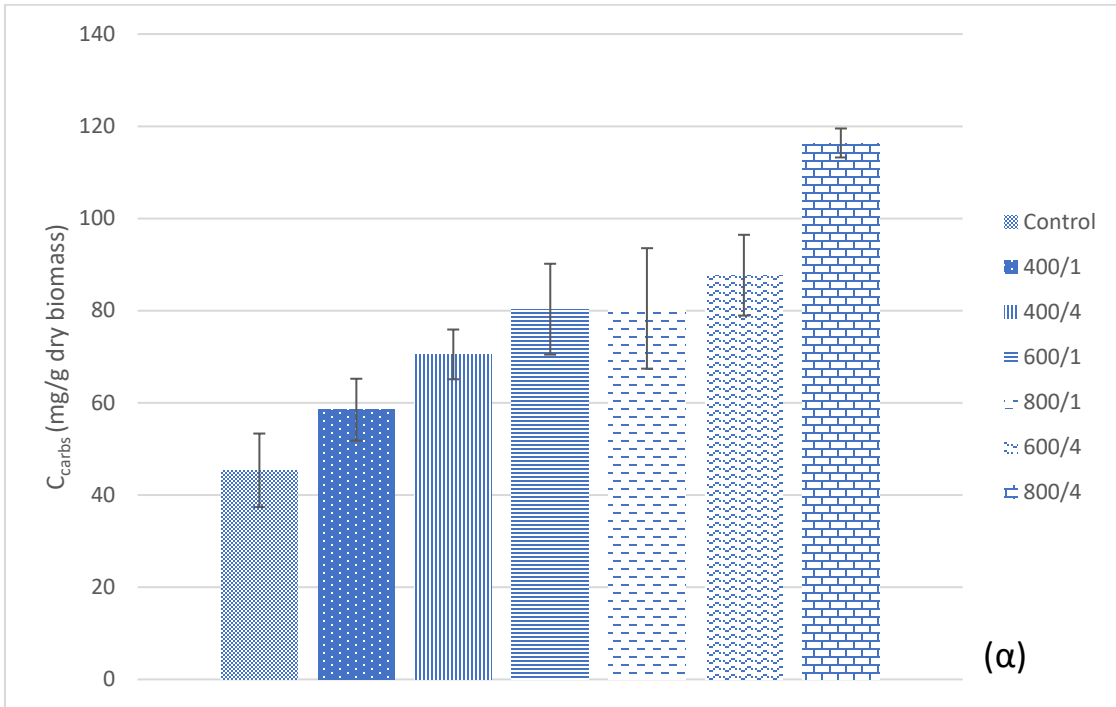
5.2.2 Υδατάνθρακες

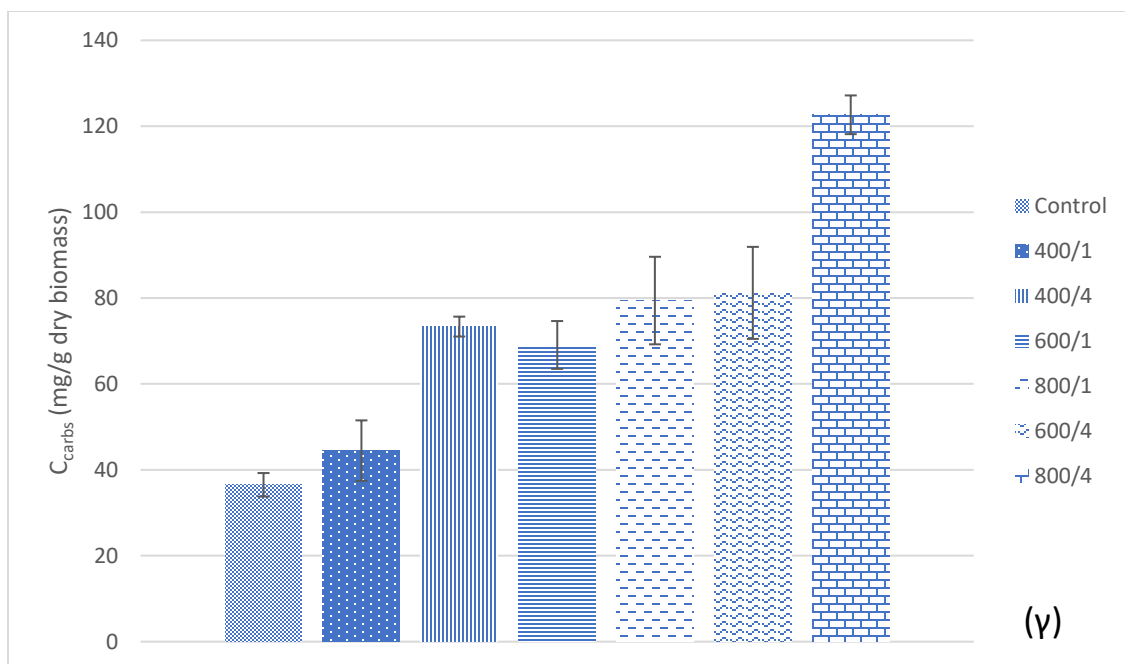
Από την υδατική εκχύλιση και τα δείγματα που προέκυψαν, προσδιορίστηκε και η περιεκτικότητα τους σε υδατάνθρακες, ώστε στην συνέχεια να εκτιμηθεί η καθαρότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες.

Όπως προαναφέρθηκε, η εντονότερη συνθήκη που εφαρμόστηκε στα αιωρήματα ήταν τα 800 bar με 10 περάσματα με την μέθοδο της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης και αυτή θεωρείται ότι προκαλεί την πλήρη διάρρηξη του κυττάρου. Έτσι, η ποσότητα υδατανθράκων που μετρήθηκε στο δείγμα που υπέστη αυτή την συνθήκη και που επώαστηκε στους 40°C για 24h θεωρείται ότι είναι η συνολική περιεκτικότητα του κυττάρου του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα και είναι ίση με $158.5 \pm 9.4 \left(\frac{mg \text{ υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ανακτημένη συγκέντρωση των υδατανθράκων στα εκχυλίσματα για $t=6h$, για τις 3 θερμοκρασίες εκχύλισης. Επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν οι αποδόσεις των 6 h καθώς τότε έχει επιτευχθεί σε όλες τις περιπτώσεις απόδοση εκχύλισης τουλάχιστον ίση με το 90% των τελικά ανακτημένων πρωτεϊνών, εξετάζοντας την

διεργασία ως προς την μεγιστοποίηση της ανάκτησης των πρωτεϊνών, βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν παραπάνω.





Διάγραμμα 16. Ανάκτηση των υδατανθράκων του μικροφύκου *C. rygenoidosa* όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα για χρόνο εκχύλισης $t=6h$ και για θερμοκρασία εκχύλισης $20^{\circ}C$ (α), $30^{\circ}C$ (β) και $40^{\circ}C$ (γ). Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται επίσης οι αρχικές ($t=0$) και τελικές ($t=24h$) συγκεντρώσεις των ανακτημένων υδατανθράκων για κάθε θερμοκρασία εκχύλισης.

Πίνακας 19. Αρχικές ($t=0$) και τελικές ($t=24h$) συγκεντρώσεις των ανακτημένων υδατανθράκων εκφρασμένες σε $\frac{mg \text{ υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για κάθε συνθήκη επεξεργασίας και για κάθε θερμοκρασία εκχύλισης

Συνθήκη επεξεργασίας	20°C		30°C		40°C	
	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=0$	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=24h$	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=0$	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=24h$	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=0$	Ανακτημένη συγκέντρωση για $t=24h$
Control	32.1 ± 2.2	49.6 ± 6.9	26.2 ± 3.9	55.9 ± 6.8	25.4 ± 2.7	48.7 ± 4.4
400/1	48.2 ± 7.0	61.6 ± 8.4	38.5 ± 7.4	65.2 ± 4.0	27.5 ± 4.3	56.1 ± 10.8
400/4	50.1 ± 9.5	79.5 ± 9.6	53.3 ± 9.1	75.3 ± 13.1	58.4 ± 5.8	78.4 ± 12.5
600/1	60.3 ± 5.1	87.2 ± 8.3	47.2 ± 6.2	75.2 ± 7.8	47.5 ± 2.4	70.1 ± 6.0
800/1	69.0 ± 9.6	90.4 ± 7.4	68.4 ± 8.7	93.6 ± 13.1	59.7 ± 7.3	90.5 ± 7.0
600/4	70.4 ± 5.6	89.9 ± 5.9	75.3 ± 5.9	90.7 ± 14.9	67.1 ± 4.1	93.4 ± 12.4
800/4	96.9 ± 5.5	121.3 ± 9.2	103.3 ± 3.4	128.2 ± 7.5	94.5 ± 11.3	129.8 ± 7.7

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και τους παραπάνω πίνακες, η θερμοκρασία φαίνεται πως δεν επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα, εξετάζοντας την ανάκτηση των υδατανθράκων στο ανεπεξέργαστο δείγμα, για χρόνο εκχύλισης $t=24h$ και για τις τρεις θερμοκρασίες εκχύλισης, $T = 20^{\circ}C$, $T = 30^{\circ}C$ και $T = 40^{\circ}C$, οι περιεκτικότητες των

εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες είναι $c = 49.6 \pm 6.9 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$, $c = 55.9 \pm 6.8 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$ και $c = 48.7 \pm 4.4 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$, αντίστοιχα. Παρόμοια είναι και η εικόνα, εάν εξεταστεί η ανάκτηση των υδατανθράκων στο δείγμα 800/4, για χρόνο εκχύλισης $t=24h$ και για τις τρεις θερμοκρασίες εκχύλισης, $T = 20^{\circ}C$, $T = 30^{\circ}C$ και $T = 40^{\circ}C$, όπου οι περιεκτικότητες των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες είναι $c = 121.3 \pm 9.2 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$, $c = 128.2 \pm 7.5 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$ και $c = 129.8 \pm 7.9 \left(mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}} \right)$, αντίστοιχα. Αντίθετα με την επίδραση της θερμοκρασίας, η επίδραση της επεξεργασίας με την τεχνολογία της ομογενοποίησης με υψηλή πίεση είναι σημαντική, καθώς όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα όσο αυξάνεται η ένταση της επεξεργασίας, τόσο αυξάνεται και η ανάκτηση των υδατανθράκων στα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, μεταξύ του ανεπεξέργαστου δείγματος Control και του δείγματος 800/4 η αύξηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες είναι 334%, ενώ μεταξύ του ανεπεξέργαστου δείγματος Control και του δείγματος 600/4 η αντίστοιχη αύξηση είναι 222%.

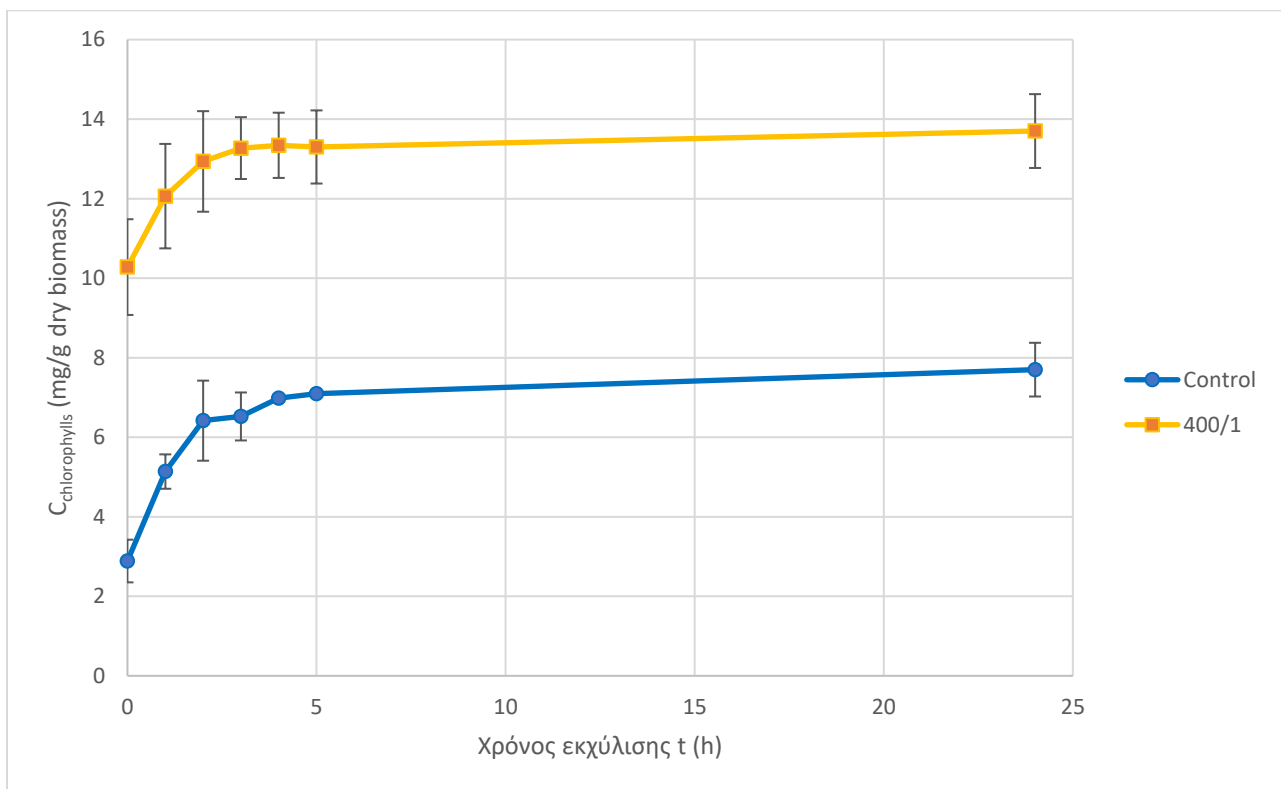
Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως, σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται η μεγαλύτερη ποσότητα των υδατανθράκων να εκχυλίζεται μέχρι τις πρώτες 6 h της εκχύλισης και στην συνέχεια ο ρυθμός ανάκτησης μειώνεται σημαντικά. Συγκεκριμένα, στο ανεπεξέργαστο δείγμα Control μεταξύ 0h και 6h εντοπίζεται αύξηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες κατά 29% ενώ μεταξύ 6h και 24h, η αντίστοιχη αύξηση είναι 8%. Παρόμοια, για το δείγμα 800/4 μεταξύ 0h και 6h εντοπίζεται αύξηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες κατά 17% ενώ μεταξύ 6h και 24h, η αντίστοιχη αύξηση είναι μόλις 4%. Επιπλέον, παρατηρώντας από τον παραπάνω πίνακα την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες για $t=0$ και συγκρίνοντας την με την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες για $t=24h$, συμπεραίνεται πως ήδη από τον χρόνο $t=0$ το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων έχει εκχυλιστεί. Συγκεκριμένα, για το δείγμα Control και για $t=0$ έχει ανακτηθεί το 64% της τελικής περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε υδατάνθρακες, για το δείγμα 600/4 και για $t=0$ έχει ανακτηθεί το 78% και για δείγμα 800/4 και για $t=0$ έχει ανακτηθεί το 80%.

Συμπεραίνεται, επομένως, ότι η εκχύλιση των υδατανθράκων, επηρεάζεται από την ένταση της επεξεργασίας με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης αλλά όχι από την θερμοκρασία εκχύλισης. Παράλληλα, σημειώνεται πως η εκχύλιση τους πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα ενώ φαίνεται πως ήδη από τον χρόνο εκχύλισης $t=0$ το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων έχει εκχυλιστεί. Το φαινόμενο αυτό, πιθανώς εξηγείται από το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα του, συνεπώς παραλαμβάνεται αμέσως μετά την επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, ενώ οι υπόλοιποι υδατάνθρακες στο εσωτερικό του κυττάρου εκχυλίζονται εύκολα λόγω μικρού μοριακού βάρους.

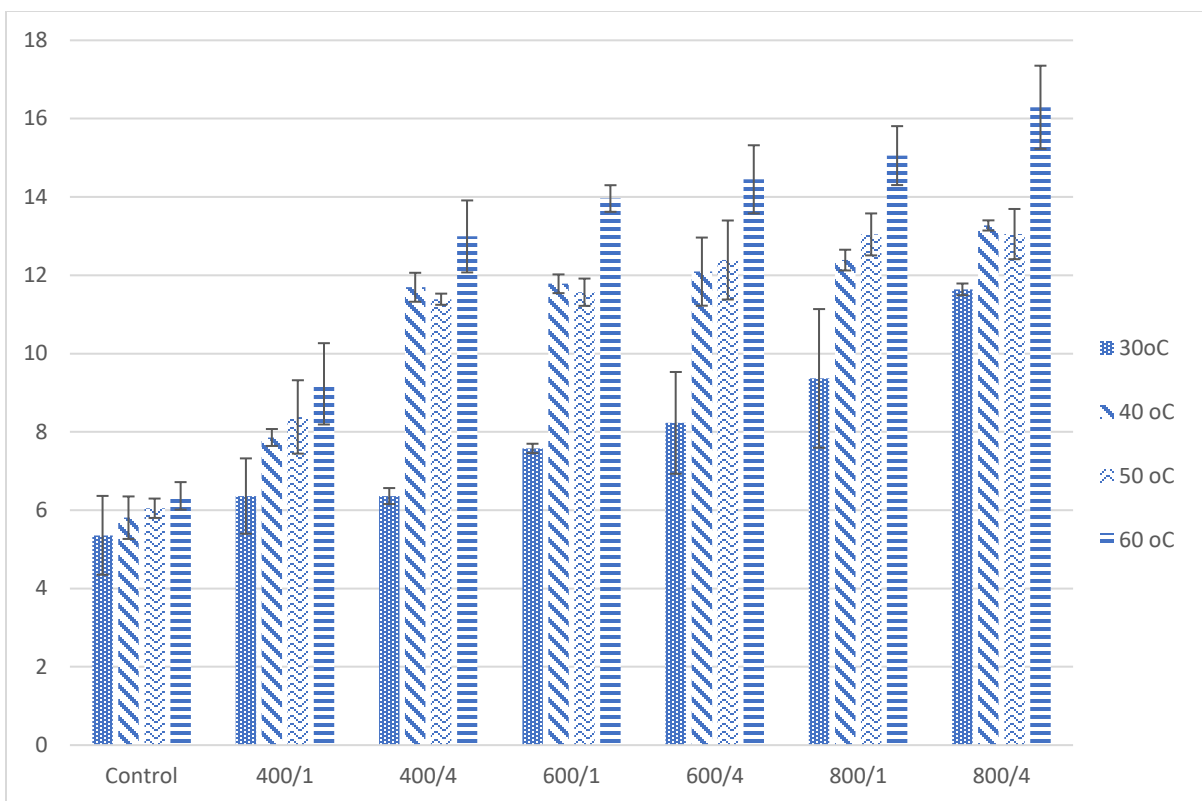
5.2.3 Χλωροφύλλες

Για την εκχύλιση των χλωροφυλλών, καθώς αυτές δεν είναι υδατοδιαλυτές ουσίες, πραγματοποιήθηκε αιθανολική εκχύλιση όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4. Ο προσδιορισμός τους έγινε με σκοπό την εκτίμηση της καθαρότητας των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, για τις 2 συνθήκες εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν, το ανεπεξέργαστο δείγμα Control και την επεξεργασία με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης σε πίεση 400 bar και με 1 πέρασμα, σε θερμοκρασία εκχύλισης 30°C, φαίνεται πως η εκχύλιση ολοκληρώνεται πρακτικά σε σύντομο διάστημα, και συγκεκριμένα, μπορεί να θεωρηθεί πως οι 2h είναι το πρώτο σημείο του πλατό και εκείνη την χρονική στιγμή της εκχύλισης η απόδοση εκχύλισης σε χλωροφύλλες ισούται τουλάχιστον με το 90% της απόδοσης στις 24h εκχύλισης. Εφόσον ανεπεξέργαστη και επεξεργασμένη βιομάζα με την ηπιότερη συνθήκη των 400/1 επέδειξαν αυτή τη συμπεριφορά, θεωρήθηκε πως και για τις εντονότερες συνθήκες η εκχύλιση των χλωροφυλλών θα έχει ολοκληρωθεί στις 2 h εκχύλισης. Έτσι, οι υπόλοιπες συνθήκες εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν είχαν διάρκεια 2 h.



Διάγραμμα 17. Ανακτημένη συγκέντρωση χλωροφυλλών σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C. Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.



Διάγραμμα 18. Ανάκτηση χλωροφυλλών από το κύτταρο του μικροφύκου *C.pyrenoidosa* με εφαρμογή ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, αιθανολική εκχύλιση και εκχύλιση σε θερμοκρασία 30 °C, 40 °C, 50 °C και 60 °C για χρόνο εκχύλισης $t=2h$. Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα, η επίδραση της επεξεργασίας με την τεχνολογία της ομογενοποίησης υψηλής πίεσης επιδρά σημαντικά στην εκχύλιση των χλωροφυλλών και μάλιστα η αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης σε χλωροφύλλες είναι ανάλογη με τη αύξηση της έντασης της επεξεργασίας. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως στην περίπτωση της θερμοκρασίας εκχύλισης των 60 °C για χρόνο εκχύλισης $t=2h$ η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων έχει την τιμή $c = 6.37 \pm 0.35 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για το ανεπεξέργαστο δείγμα Control, $c = 9.23 \pm 1.0 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για το δείγμα 400/1, $c = 13.0 \pm 0.92 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για το δείγμα 400/4, $c = 15.1 \pm 0.75 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για το δείγμα 800/1 και $c = 16.3 \pm 1.1 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ για το δείγμα 800/4.

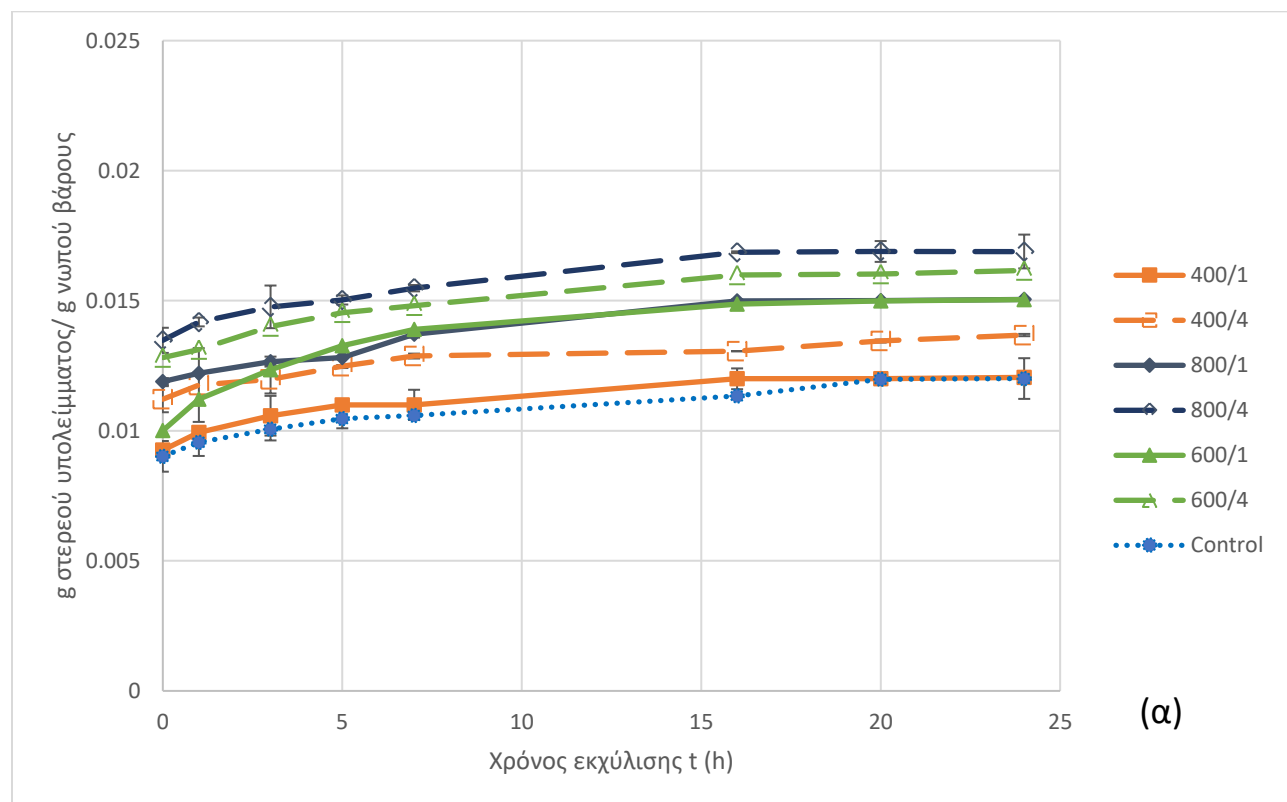
Παράλληλα, σύμφωνα με το διάγραμμα σημαντική φαίνεται να είναι και η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και συγκεκριμένα η αύξηση της ευνοεί την εκχύλιση των χλωροφυλλών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι για την συνθήκη 800/4 και για χρόνο εκχύλισης $t=2h$ στους 30°C η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε χλωροφύλλες είναι $c = 11.6 \pm 0.15 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$,

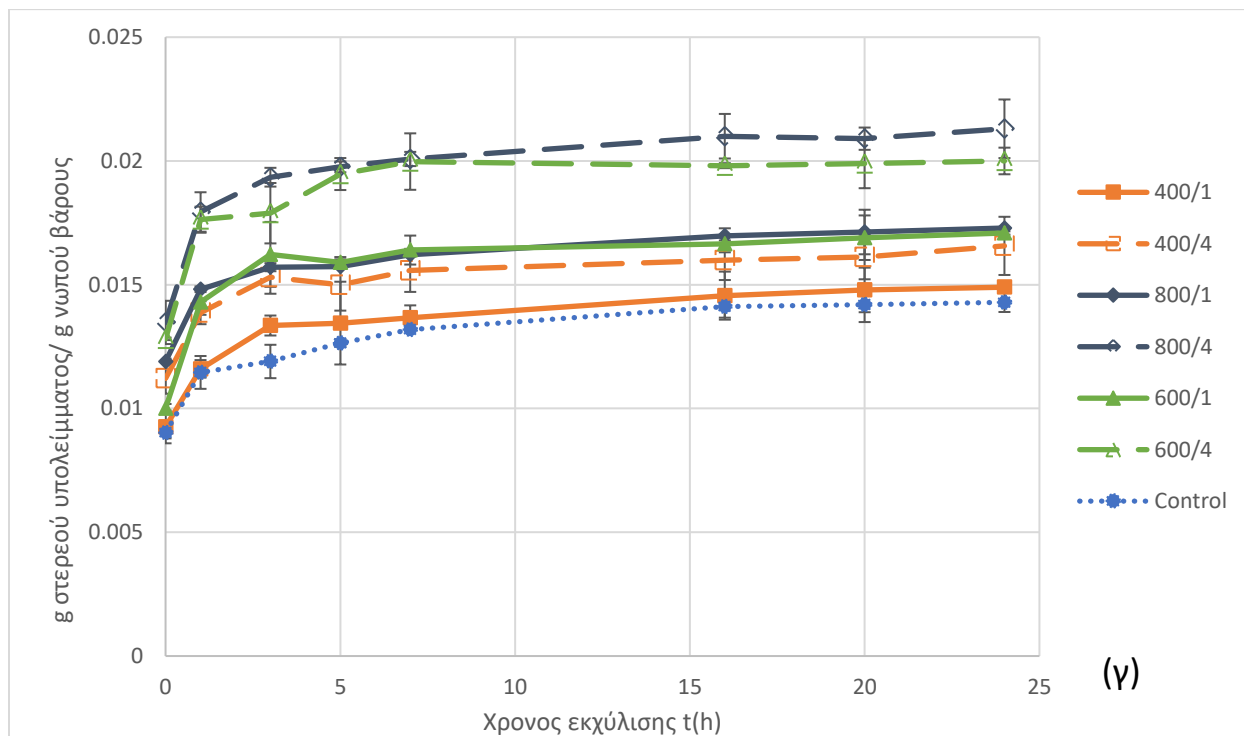
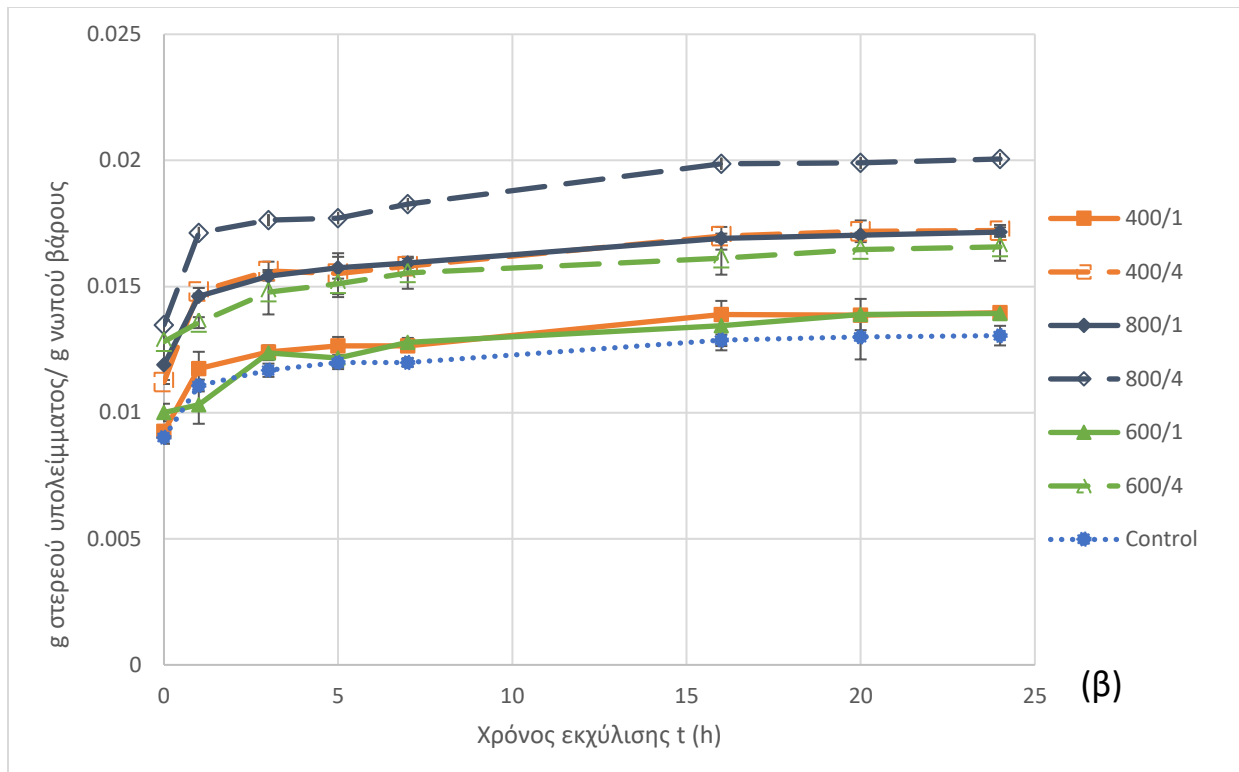
στους 40 °C είναι $c = 13.3 \pm 0.13 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$, στους 50 °C είναι $c = 13.6 \pm 0.64 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ και στους 60 °C είναι $c = 16.3 \pm 1.1 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$.

Συνολικά, συμπεραίνεται ότι τόσο η ένταση της επεξεργασίας όσο και η θερμοκρασία εκχύλισης των δειγμάτων επιδρούν στην εκχύλιση των χλωροφυλλών, ενώ στα πλαίσια του πειράματος που πραγματοποιήθηκε, η θερμοκρασία εκχύλισης των 60°C βρέθηκε να είναι η πιο ευνοϊκή για την ανάκτηση των χλωροφυλλών, οδηγώντας στην μέγιστη απόδοση εκχύλισης χλωροφυλλών. Αυτό δικαιολογείται καθώς σε υψηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης αυξάνεται η κινητική ενέργεια των μορίων και συνεπώς ευνοείται η μεταφορά μάζας, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις ανάκτησης χλωροφυλλών.

5.3 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος εκχυλισμάτων

Σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν προσδιορίστηκαν τα στερεά υπολείμματα των δειγμάτων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.





Διάγραμμα 19. Στερεά υπολείμματα δειγμάτων αιωρήματος 2.5% w/w του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* για θερμοκρασία εκχύλισης 20 °C (α), 30 °C(β) και 40°C (γ). Γραμμές με τελείες: ανεπεξέργαστο δείγμα, συνεχείς γραμμές: επεξεργασμένα δείγματα με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης με ένα πέρασμα, διακεκομμένες γραμμές: επεξεργασμένα δείγματα με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης με τέσσερα περάσματα. Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας αλλά και αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης αυξάνεται το στερεό υπόλειμμα των δειγμάτων. Η παρατήρηση αυτή, συνάδει με τα προηγούμενα συμπεράσματα της εκχύλισης των πρωτεϊνών, καθώς όπως έχει διαπιστωθεί, με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας και με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης η απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών αυξάνεται, επομένως είναι λογικό το στερεό υπόλειμμα να αυξάνεται αναλόγως, αφού εμπλουτίζεται με περισσότερες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως για το δείγμα 800/4 για χρόνο εκχύλισης $t=24\text{h}$ και για θερμοκρασία εκχύλισης 40°C το στερεό υπόλειμμα είναι ίσο με $0.0213 \pm 0.0012 \frac{\text{g ξηρού βάρους}}{\text{g νωπού βάρους}}$ ενώ η αντίστοιχη τιμή για εκχύλιση στους 20°C είναι $0.0169 \pm 0.00065 \frac{\text{g ξηρού βάρους}}{\text{g νωπού βάρους}}$, δηλαδή εντοπίζεται αύξηση 185%. Επιπλέον αξίζει να συγκριθεί η τιμή στερεού υπολείμματος του ανεπεξέργαστου δείγματος και η τιμή για το δείγμα 800/4 για χρόνο εκχύλισης $t=24\text{h}$ και για θερμοκρασία εκχύλισης 40°C . Οι τιμές αυτές είναι $0.0143 \pm 0.00010 \frac{\text{g ξηρού βάρους}}{\text{g νωπού βάρους}}$ και $0.0213 \pm 0.0012 \frac{\text{g ξηρού βάρους}}{\text{g νωπού βάρους}}$, αντίστοιχα, δηλαδή η τιμή του δείγματος 800/4 είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος. Επίσης, ποιοτικά παρατηρείται αύξηση του ρυθμού αύξησης του στερεού υπολείμματος με τον χρόνο εκχύλισης για όλα τα δείγματα με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης.

5.4 Συνδυαστικό πείραμα

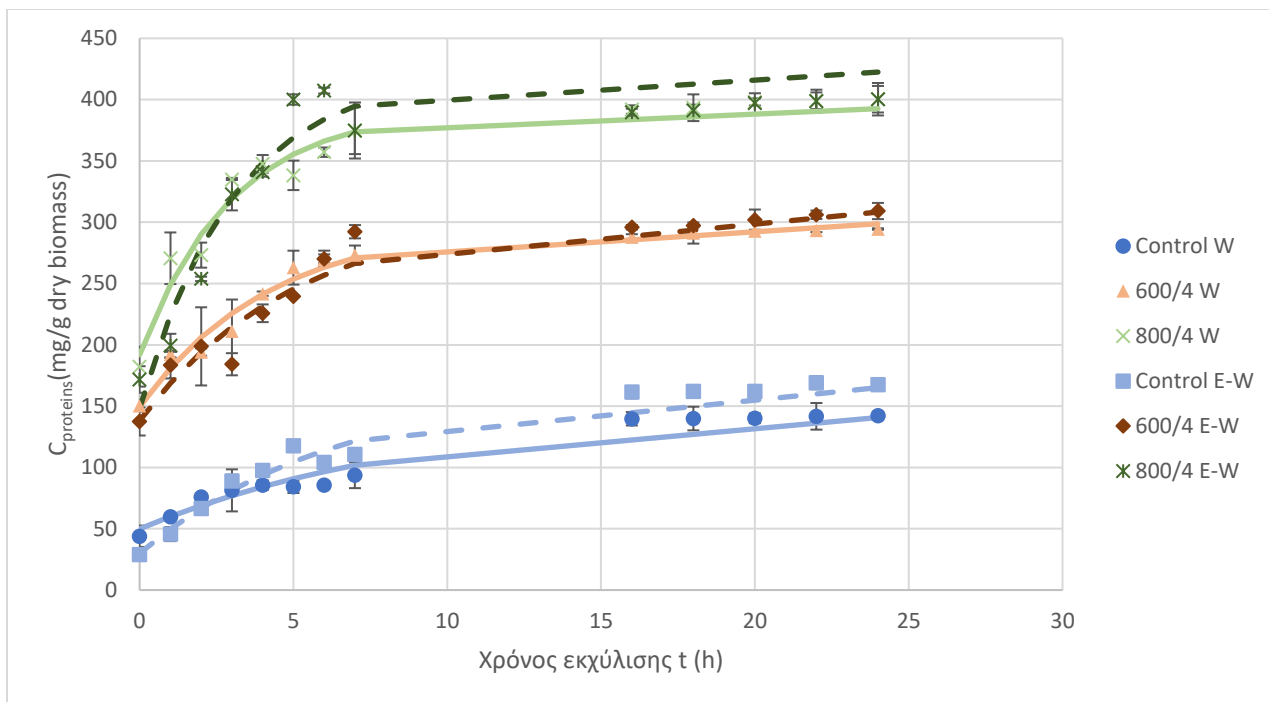
5.4.1 Εισαγωγή

Καθώς οι πρωτεΐνες του μικροφύκου είναι φωτοσυνθετικές δημιουργούνται διαμοριακοί δεσμοί μεταξύ αυτών και των χλωροφυλλών, με αποτέλεσμα τα εκχυλίσματα των πρωτεϊνών να είναι πράσινα. Παράλληλα, όπως συζητήθηκε κατά την υδατική εκχύλιση παραλαμβάνονται και υδατάνθρακες. Έτσι, σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η παραλαβή όσο το δυνατόν καθαρότερων σε πρωτεΐνη εκχυλισμάτων, με την μέθοδο που αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοκρασίες εκχύλισης στις οποίες παρατηρήθηκαν από προηγούμενα πειράματα ότι εντοπίστηκε η μέγιστη ανάκτηση πρωτεϊνών και χλωροφυλλών, δηλαδή 40°C και 60°C , αντίστοιχα.

5.4.2 Σύγκριση βαθμού ανάκτησης πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C.pyrenoidosa* με υδατική εκχύλιση και με συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης

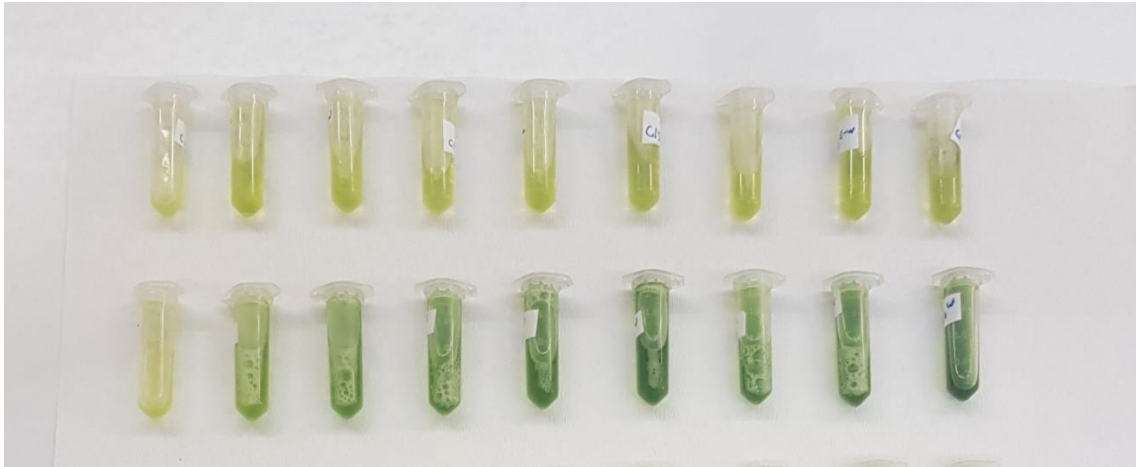
Παρακάτω παρουσιάζεται η ανάκτηση πρωτεϊνών που επιτεύχθηκε με εφαρμογή ομογενοποίησης υψηλής πίεσης στις συνθήκες 600/4 και 800/4. Η συνθήκη 800/4 επιλέχθηκε καθώς από τα προηγούμενα πειράματα αποδείχθηκε η πιο αποδοτική στην εκχύλιση των πρωτεϊνών, γεγονός αναμενόμενο καθώς είναι η εντονότερη συνθήκη, ενώ η συνθήκη 600/4 επιλέχθηκε ως μια ενδιάμεση συνθήκη ικανοποιητικής απόδοσης.



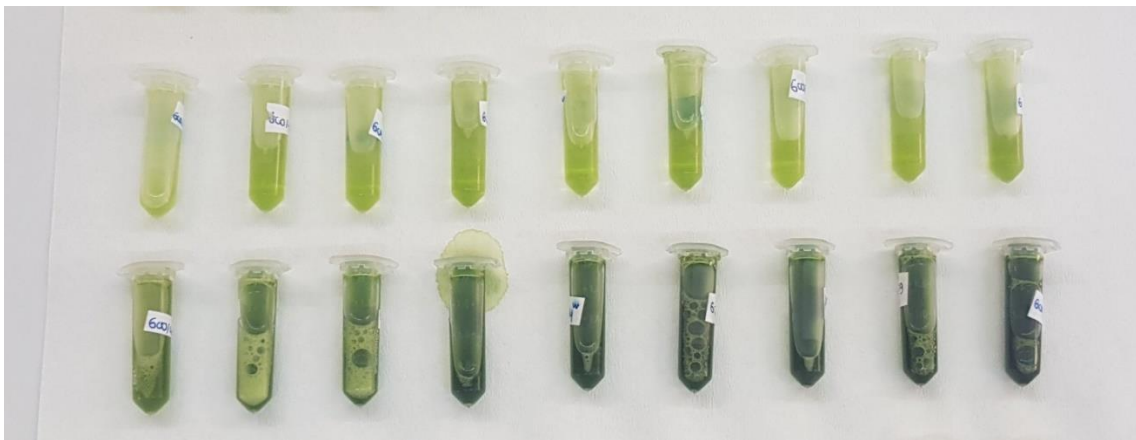
Διάγραμμα 20. Ανάκτηση των πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. ryrenoidosa* όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα (σημεία) υδατικής εκχύλισης (συνεχείς γραμμές) και συνδυασμού αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης (διακεκομμένες γραμμές) και όπως μοντελοποιήθηκε σύμφωνα με το μοντέλο $C=C_e-(C_o-C_e)*exp(-t/\tau)$ (συνεχής γραμμή) για θερμοκρασία εκχύλισης 40°C. Σημειώνεται πως η συντομογραφία 'W' αναφέρεται στα δείγματα τα οποία υπέστησαν υδατική εκχύλιση μόνο ενώ η συντομογραφία 'E-W' αναφέρεται στα δείγματα τα οποία υπέστησαν συνδυασμό αιθανολικής - υδατικής εκχύλισης. Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των πειραματικών σημείων.

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται πως η προεπεξεργασία των αιωρημάτων με αιθανολική εκχύλιση και η εκχύλιση τους για 2h στους 60°C δεν επηρέασε την απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών, καθώς η τελική απόδοση ανάκτησης των πρωτεϊνών στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μόνο υδατική εκχύλιση φαίνεται να είναι ανάλογη με αυτά των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς κατά το στάδιο της αιθανολικής εκχύλισης οι πρωτεΐνες δεν εκχυλίστηκαν στην αιθανόλη λόγω αδιαλυτότητας τους σε αυτόν τον διαλύτη, ενώ η εκχύλιση τους ξεκίνησε την στιγμή που το pH ρυθμίστηκε στο 13. Επίσης, να σημειωθεί πως αμέσως μετά την επεξεργασία και πριν την ρύθμιση του pH οι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες, βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν.

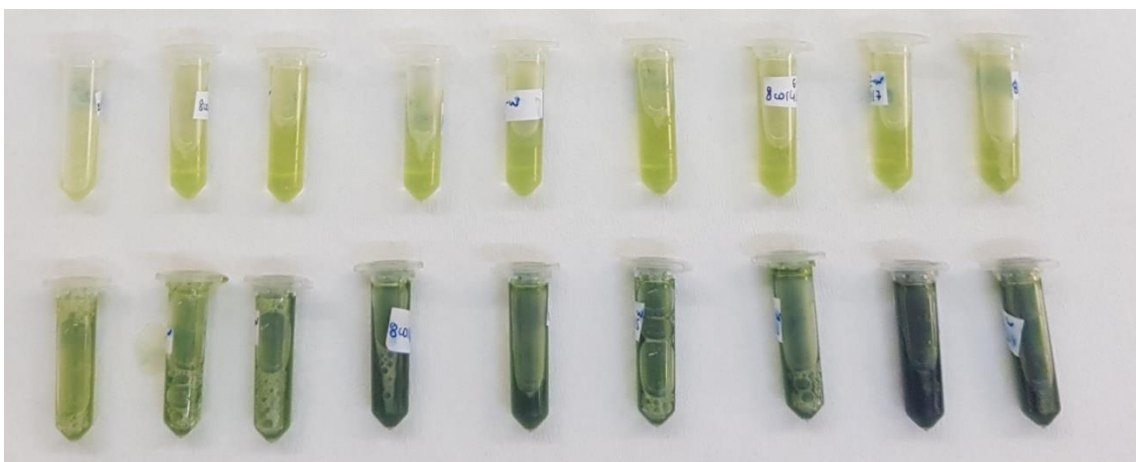
Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες των δειγμάτων για την περίπτωση του συνδυασμού αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης (πάνω σειρά) και για την περίπτωση της υδατικής εκχύλισης (κάτω σειρά), για όλες τις ώρες που λήφθηκε δείγμα. (από αριστερά προς τα δεξιά t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 h). Από το χρώμα των δειγμάτων, γίνεται και οπτικά αντιληπτό πως στην περίπτωση του συνδυασμού των δύο εκχυλίσεων έχει απομακρυνθεί σημαντική ποσότητα χλωροφυλλών σε σχέση με την περίπτωση που εφαρμόστηκε μόνο υδατική εκχύλιση.



Εικόνα 11. Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης (πάνω σειρά) και υδατική εκχύλιση (κάτω σειρά) για ώρες εκχύλισης $t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ και $24h$ για το ανεπεξέργαστο δείγμα Control



Εικόνα 12. Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης (πάνω σειρά) και υδατική εκχύλιση (κάτω σειρά) για ώρες εκχύλισης $t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ και $24h$ για το δείγμα 600/4



Εικόνα 13. Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης (πάνω σειρά) και υδατική εκχύλιση (κάτω σειρά) για ώρες εκχύλισης $t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ και $24h$ για το δείγμα 800/4

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η παραλαβή καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων, στα δείγματα, εκτός των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των χλωροφυλλών, των υδατανθράκων και των ξηρών βαρών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στις 6h έχει ανακτηθεί ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο του 90% της τελικής ανάκτησης των πρωτεϊνών για κάθε μια από τις συνθήκες Control, 600/4 και 800/4. Θεωρώντας ικανοποιητική την ανάκτηση του 90% των τελικών ανακτημένων πρωτεϊνών, τα δείγματα των 6h, θεωρούνται ορόσημο της χρονικής εξέλιξης της εκχύλισης και έτσι για τα συγκεκριμένα δείγματα, στους παρακάτω πίνακες, παρουσιάζεται η περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες, χλωροφύλλες και υδατάνθρακες ανά ξηρό βάρος εκχυλίσματος, τόσο για την υδατική εκχύλιση όσο και για τον συνδυασμό υδατικής και αιθανολικής εκχύλισης.

Πίνακας 20. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες (mg πρωτεϊνών/g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος), μετά από 6h εκχύλισης, για τις συνθήκες Control, 600/4 και 800/4, στην περίπτωση της υδατικής εκχύλισης και του συνδυασμού υδατικής και αιθανολικής εκχύλισης

Control		600/4		800/4	
Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης
196.2 ± 4.2 (mg/g)	274.4 ± 16.1 (mg/g)	382.1 ± 1.3 (mg/g)	642.3 ± 10.5 (mg/g)	584.2 ± 1.9 (mg/g)	764.7 ± 4.4 (mg/g)

Πίνακας 21. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες (mg υδατανθράκων/g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος), μετά από 6h εκχύλισης, για τις συνθήκες Control, 600/4 και 800/4, στην περίπτωση της υδατικής εκχύλισης και του συνδυασμού υδατικής και αιθανολικής εκχύλισης

Control		600/4		800/4	
Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης
73.1 ± 0.74 (mg/g)	35.3 ± 2.1 (mg/g)	155.5 ± 2.6 (mg/g)	36.5 ± 0.54 (mg/g)	183.8 ± 1.4 (mg/g)	40.9 ± 2.7 (mg/g)

Πίνακας 22. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε χλωροφύλλες (mg χλωροφυλλών/g στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος), μετά από 6h εκχύλισης, για τις συνθήκες Control, 600/4 και 800/4, στην περίπτωση της υδατικής εκχύλισης και του συνδυασμού υδατικής και αιθανολικής εκχύλισης

Control		600/4		800/4	
Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης	Υδατική εκχύλιση	Συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης
6.53 ± 0.17 (mg/g)	3.98 ± 0.25 (mg/g)	7.53 ± 0.16 (mg/g)	3.33 ± 0.25 (mg/g)	12.2 ± 0.33 (mg/g)	4.67 ± 0.97 (mg/g)

Όπως διαπιστώνεται και από τους παραπάνω πίνακες, η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες έχει αυξηθεί σημαντικά κατά την αιθανολική και στην συνέχεια υδατική εκχύλιση σε σχέση με την περίπτωση της υδατικής μόνο εκχύλισης, και συγκεκριμένα στο ανεπεξέργαστο δείγμα 800/4 παρατηρείται αύξηση 130%. Αντίθετα, όσον αφορά στην περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες και χλωροφύλλες, αυτή έχει μειωθεί σημαντικά στην περίπτωση όπου τα δείγματα αρχικά εκχυλίστηκαν σε αιθανόλη και στην συνέχεια σε απιονισμένο νερό σε σχέση με την περίπτωση που πραγματοποιήθηκε μόνο υδατική εκχύλιση. Συγκεκριμένα, για την επεξεργασία 800/4 για τους υδατάνθρακες, διαπιστώνεται μείωση 449% και για τις χλωροφύλλες η αντίστοιχη μείωση είναι 261%. Επιπλέον, παρατηρώντας τις τιμές των περιεκτικότητων των εκχυλισμάτων τόσο σε υδατάνθρακες, όσο και σε χλωροφύλλες, στην περίπτωση του συνδυασμού αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης, διαπιστώνεται πως αυτές είναι ανάλογες και στις τρεις επεξεργασίες. Από αυτή την παρατήρηση συμπεραίνεται πως κατά τον συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης, με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας με HPH, το εκχύλισμα εμπλουτίζεται περαιτέρω σε πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα, καθώς η πλειοψηφία των υδατανθράκων εντοπίζεται στο υπερκείμενο που απορρίπτεται πριν την αιθανολική εκχύλιση ενώ, όσον αφορά στις χλωροφύλλες, αυτές απομακρύνονται με την αιθανολική εκχύλιση, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4. Ο εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες οφείλεται στην μείωση των λοιπών συστατικών στα εκχυλίσματα και συνεπώς στη μείωση του ξηρού βάρους.

5.4.3 Ανακεφαλαίωση

Από την παραπάνω μελέτη, συμπεραίνεται πως η προεπεξεργασία των αιωρημάτων με αιθανολική εκχύλιση και η εκχύλιση τους για 2h στους 60°C δεν επηρέασε την απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών, καθώς η τελική απόδοση ανάκτησης των πρωτεϊνών στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μόνο υδατική εκχύλιση είναι ανάλογη με αυτά των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης. Παράλληλα, κατά την μέθοδο παραλαβής πρωτεϊνών με συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης παραλαμβάνονται καθαρότερα σε πρωτεΐνες εκχυλίσματα, τα οποία μάλιστα με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας με HPH εμπλουτίζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Τέλος, ποιοτικά παρατηρείται πως η προεπεξεργασία με αιθανόλη προκαλεί γρηγορότερο ρυθμό εκχύλισης των πρωτεϊνών κατά της πρώτες ώρες εκχύλισης, αλλά τελικά τόσο με την υδατική όσο και με τον συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης η τελική απόδοση της εκχύλισης σε πρωτεΐνες είναι ανάλογη.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα

6.1 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην τελικά ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, C_e

Αρχικά σημειώνεται πως από τα αποτελέσματα των πειραμάτων η τιμή pH=13 αξιολογήθηκε ως η πιο αποδοτική ως προς την εκχύλιση των πρωτεϊνών, καθώς παρέχει κατάλληλο αλκαλικό περιβάλλον στο οποίο οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* είναι διαλυτές.

Όσον αφορά στην επίδραση της έντασης επεξεργασίας, αυτή αποδείχθηκε πως έχει σημαντική επίδραση στην ανάκτηση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ανάλυση ANOVA και τον Πίνακα 6, συμπεραίνεται πως το ανεπεξέργαστο δείγμα Control παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με όλα τα δείγματα που έχουν υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία, από την ηπιότερη συνθήκη των 400 bar και 1 περάσματος (400/1) μέχρι την εντονότερη των 800 bar και 4 περασμάτων (800/4). Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η τελική απόδοση της εκχύλισης σε πρωτεΐνες στους 40 °C με την επεξεργασία 800/4 αυξήθηκε κατά 264%, συγκρινόμενο με το ανεπεξέργαστο δείγμα Control.

Όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας αυτή επίσης έχει σημαντική επίδραση στην ανάκτηση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ανάλυση ANOVA και τον Πίνακα 6 συμπεραίνεται πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τελικές αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών των δειγμάτων που υπέστησαν την ίδια επεξεργασία αλλά επώαστηκαν σε διαφορετική θερμοκρασία. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως στο δείγμα Control από τους 20 °C στους 40 °C σημειώθηκε αύξηση 121% των τελικών αποδόσεων ανάκτησης πρωτεϊνών, ενώ στο δείγμα 800/4 η αντίστοιχη αύξηση είναι 156%.

Αξίζει να σημειωθεί, πως σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης ANOVA, προκύπτει το συμπέρασμα πως με ηπιότερες συνθήκες επεξεργασίας και υψηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης μπορούν να επιτευχθούν ανάλογες τελικές αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες 800/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C και 600/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C επιτυγχάνουν τις ίδιες τελικές αποδόσεις ανάκτησης με τις συνθήκες 400/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C και 600/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C. Ανάλογα, η συνθήκη 600/4 σε θερμοκρασία εκχύλισης 20 °C δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με το δείγμα 600/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C και το δείγμα 400/1 σε θερμοκρασία εκχύλισης 40 °C.

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης επιδρά σημαντικά στην εκχύλιση των πρωτεϊνών, αλλά εξίσου σημαντική είναι και η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης, αφού όσο αυτή αυξάνεται, παρατηρείται αύξηση της ανακτημένης συγκέντρωσης πρωτεϊνών κυρίως στα επεξεργασμένα δείγματα με παράλληλη μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου εκχύλισης. αυξάνονται. Σε αυτό το πλαίσιο, παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη ανάκτηση πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C.pyrenoidosa* επιτυγχάνεται όταν αυτό υπόκειται σε επεξεργασία με HPH στα 800 bar και στα 4 περάσματα (800/4) και εκχύλιση στους 40 °C και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες είναι 406.3 ± 4.8 mg/g ξηρής σκόνης μικροφύκου.

6.2 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH στην ανακτημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, C_o , στον χρόνο $t=0$

Σύμφωνα με την ανάλυση ANOVA που πραγματοποιήθηκε στις τιμές του Πίνακα 7, η αρχική απόδοση ανάκτησης πρωτεϊνών του ανεπεξέργαστου δείγματος Control είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη που προέκυψε μετά από την επεξεργασία 800/4 και συγκεκριμένα εντοπίζεται αύξηση 423%.

Αντίστοιχα με τις τελικές αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών, και για τις αρχικές αποδόσεις ανάκτησης εντοπίζονται συνθήκες επεξεργασίας οι οποίες οδηγούν σε ανάλογες τιμές ανάκτησης. Αυτές οι συνθήκες είναι οι 800/1, 400/4 και 600/4.

6.3 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH στον χαρακτηριστικό χρόνο, τ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση ANOVA, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, συμπεραίνεται πως αυξανόμενης της έντασης επεξεργασίας, είτε με αύξηση της πίεσης επεξεργασίας είτε με αύξηση του αριθμού περασμάτων, η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στον χαρακτηριστικό χρόνο τ μειώνεται, ενώ αυξάνεται η επίδραση της επεξεργασίας.

Επιπλέον, παρατηρείται πως η παράμετρος τ έχει μια τάση μείωσης όσο αυξάνεται η ένταση της επεξεργασίας, αποτέλεσμα από το οποίο συμπεραίνεται πως με εντονότερες επεξεργασίες λαμβάνονται συντομότερα μεγαλύτερες αποδόσεις ανάκτησης πρωτεϊνών.

6.4 Επίδραση της επεξεργασίας με την μέθοδο HPH και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην παραλαβή υδατανθράκων στα εκχυλίσματα

Η εκχύλιση των υδατανθράκων, επηρεάζεται από την ένταση της επεξεργασίας με ομογενοποίηση υψηλής πίεσης αλλά όχι από τη θερμοκρασία εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η μέγιστη ανάκτηση υδατανθράκων επιτεύχθηκε με την συνθήκη επεξεργασίας 800/4 και έχει την τιμή 129.8 ± 7.9 ($mg \frac{\text{υδατανθράκων}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$) ενώ συγκρινόμενη με την τιμή της ανακτημένης συγκέντρωσης υδατανθράκων από ανεπεξέργαστη βιομάζα είναι αυξημένη κατά 334%.

Παράλληλα, σημειώνεται πως η εκχύλιση τους πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα ενώ φαίνεται πως ήδη από τον χρόνο εκχύλισης $t=0$ το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων έχει εκχυλιστεί.

6.5 Επίδραση της έντασης επεξεργασίας με την μέθοδο HPH και της θερμοκρασίας εκχύλισης στην παραλαβή χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα

Όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα, η αιθανολική εκχύλιση των χλωροφυλλών πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, και συγκεκριμένα σε χρόνο εκχύλισης 2h έχει ανακτηθεί τουλάχιστον το 90% της τελικής απόδοσης. Συνολικά, συμπεραίνεται ότι τόσο η ένταση της επεξεργασίας όσο και η θερμοκρασία εκχύλισης των δειγμάτων επιδρούν στην εκχύλιση των χλωροφυλλών, ενώ στα πλαίσια του πειράματος που πραγματοποιήθηκε η

ευνοϊκότερη συνθήκη επεξεργασίας για την παραλαβή χλωροφυλλών ήταν η 800/4 με θερμοκρασία εκχύλισης τους 60°C, κατά την οποία παραλήφθηκαν $16.3 \pm 1.1 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$ από τα $18.45 \pm 0.89 \frac{mg \text{ χλωροφυλλών}}{g \text{ ξηρής βιομάζας}}$, η οποία είναι η τιμή των ολικών χλωροφυλλών που περιέχει η βιομάζα κατά μέσο όρο.

6.6 Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας συνδυασμού αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης μετά από επεξεργασία με HPH στην παραλαβή καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων Από το πειραματικά αποτελέσματα, συμπεραίνεται πως η αιθανολική εκχύλιση για 2h στους 60°C δεν επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης των πρωτεϊνών στην μετέπειτα εκχύλιση των πρωτεϊνών, καθώς οι τελικές αποδόσεις ανάκτησης των πρωτεϊνών στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μόνο υδατική εκχύλιση είναι ανάλογες με αυτές των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε συνδυασμός αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης.

Παράλληλα, κατά την μέθοδο παραλαβής πρωτεϊνών με συνδυασμό αιθανολικής και υδατικής εκχύλισης παραλαμβάνονται καθαρότερα σε πρωτεΐνες εκχυλίσματα, τα οποία μάλιστα με αύξηση της έντασης της επεξεργασίας με HPH εμπλουτίζονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Ενδεικτικά, αναφέρεται πως κατά την υδατική εκχύλιση, στην συνθήκη επεξεργασίας 800/4, η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες είναι 584.2 ± 1.9 (mg/g ξηρού βάρους) έναντι της τιμής 764.7 ± 4.4 (mg/g), η οποία επιτυγχάνεται κατά τον συνδυασμό υδατικής και υδατικής εκχύλισης, ενώ για την ίδια συνθήκη επεξεργασίας επιτυγχάνεται με το συνδυασμό των δύο εκχυλίσεων μείωση της περιεκτικότητας των υδατανθράκων κατά 449% και των χλωροφυλλών κατά 261%.

6.7 Προτάσεις για μελλοντική μελέτη

Μια πρόταση που παρουσιάζει ενδιαφέρον θα ήταν η μελέτη της ανάκτησης πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C.pyrenoidosa* με χρήση της καινοτόμου τεχνικής των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων ως μέθοδο κυτταρικής διάρρηξης. Η μέθοδος PEF είναι μια πιο επιλεκτική διεργασία σε σχέση με την HPH, λόγω της δημιουργίας πόρων στην μεμβράνη και όχι της θραύσης του κυττάρου, συνεπώς θα ήταν δυνατή η παραλαβή καθαρότερων σε πρωτεΐνες εκχυλισμάτων χωρίς να απαιτείται προεπεξεργασία του αιωρήματος με αιθανολική εκχύλιση. Παρότι, βιβλιογραφικά, φαίνεται πως η μέθοδος PEF δεν είναι αποτελεσματική για την ανάκτηση πρωτεϊνών από το μικροφύκος, πιθανώς ο συνδυασμός της με την ρύθμιση του pH σε αλκαλικό περιβάλλον να είναι αποδοτικός και να ανοίξει νέους ορίζοντες στο συγκεκριμένο κλάδο. (Ursu et al, 2014).

Επίσης, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, το στερεό υπόλειμμα, που προκύπτει έπειτα από την παραλαβή των πρωτεϊνών από το κύτταρο του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* και τον διαχωρισμό του από το εκχύλισμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε τρόφιμα, καθώς είναι πλούσιο σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Παράλληλα, ένας ακόμα τρόπος για την αξιοποίηση του στερεού υπολείμματος είναι η χρήση του ως φορέα ενθυλάκωσης, καθώς είναι αρκετά σύνηθες, κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί κάποια διεργασία για αύξηση της διαπερατότητας τους να χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό και μάλιστα, λόγω της διεργασίας

που έχουν υποστεί είναι κατάλληλα για ενθυλάκωση και διευκολύνουν την διεργασία (Dimopoulos, Katsimichas et al, 2021).

Επιπλέον, ενδιαφέρουσα θα ήταν και μια μελέτη χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών του μικροφύκου. Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να διερευνηθεί η λειτουργικότητα τους, η περιεκτικότητα τους σε αμινοξέα, απαραίτητα και μη, ενώ θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μια μελέτη που να αφορά στη μετουσίωση τους, δηλαδή τον έλεγχο της ανθεκτικότητας τους στην αύξηση της θερμοκρασίας και στην αύξηση του pH. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η βιολογική αξία των πρωτεϊνών και να δοθεί το έναυσμα για την ευρύτερη αξιοποίηση τους στην ανθρώπινη διατροφή αλλά και στις ζωοτροφές, ως μια εναλλακτική πηγή φυτικών πρωτεϊνών.

Τέλος, σε μια προσπάθεια ένταξης των πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* στην καθημερινή διατροφή, θα μπορούσε να μελετηθεί η ενσωμάτωση τους αρχικά σε ένα σύστημα μοντέλο και στην συνέχεια σε τρόφιμα, όπως παραδείγματος χάρη σε αλεύρι ή σε ζυμαρικά και να παρατηρηθεί η συμπεριφορά τους, ενώ θα μπορούσαν να μελετηθεί και η μορφοποίηση τους σε συμπληρώματα διατροφής. Η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών του μικροφύκου *C. pyrenoidosa* σε τρόφιμο θα απαιτούσε την μικροβιακή μελέτη του συστήματος, καθώς και την εφαρμογή οργανοληπτικών δοκιμών, ώστε η ασφάλεια του τροφίμου να συνδυαστεί με ευχάριστα χαρακτηριστικά (όπως γεύση, οσμή κ.α.) προς τον καταναλωτή.

Βιβλιογραφία

- Amarni, F., Kadi, H. (2010) *Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from oil cake using hexane: comparison with the conventional extraction*, Innovative Food Sci. Emerg. Technol., 11, pp. 322-327
- Becerra, G., Menolasina, S., Salvador, A. (1999). *Supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography of Vitamin E in pharmaceutical preparations*. J High Resolut Chromatogr. 22:300–2
- Berk, Z. (2018). *Mixing*. Food Process Engineering and Technology, 193–217
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E. (1983). *Cell wall composition of chlorococcal algae*. Phytochemistry. 22:1603–4
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. (1997). *Nutritional properties of microalgae for mariculture*. Aquaculture. 151:315–31
- Carullo, D., Abera, B.D., Scognamiglio, M., Donsi, F., Ferrari, G., Pataro, G. (2022). *Application of Pulsed Electric Fields and High Pressure Homogenization in Biorefinary Cascade of C. vulgaris microalgae*, Foods, 11(3), 471
- Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsi, F., Perego, P., Ferrari, G., Pataro, G. (2018). *Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae Chlorella vulgaris*. Algal Research, 31, 60–69
- Chen, W., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2011). *Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae*. Bioresour Technol, 102:135–41
- Concas, A., Pisu, M., Coa, G., (2015). *Microalgae cell disruption through Fenton reaction: experiments, modeling and remarks on its effect on the extracted lipids composition*. Chem. Eng. Trans. 43, 367-372
- Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A.M.M., Pereira, L. (2020). *A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta)*, Life, 10, pp. 1-23
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Bastiaens, L. (2017). *Cell disruption technologies*. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts, 133–154
- Demuez, M., Gonzalez-Fernandez, C., Ballesteros, M. (2015). *Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption*, Biotechnol. Adv., 33, pp. 1615-1625
- Dimopoulos, G., Katsimichas, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., Taoukis, P., (2021). *Cell permeabilization processes for improved encapsulation of oregano essential oil in yeast cells*. Journal of Food Engineering, 294

- Dimopoulos, G., Limnaios, A., Aerakis, E., Andreou, V., Taoukis, P., (2021). *Effect of high pressure on the proteolytic activity and autolysis of yeast Saccharomyces cerevisiae*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 74
- Dong, T., Knoshaug, E.P., Pienkos, P.T., Laurens, L.M.L., (2016). *Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review*. Appl. Energy 177, 879-895
- Dong, T., Knoshaug, E.P., Pienkos, P.T., Laurens, L.M.L. (2016). *Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review*, Appl. Energy, 177, pp. 879-895
- Fritsch, F.E. (1977) *The structure and reproduction of the algae*, Cambridge Univ. Press, 2, Cambridge
- Gerken, H. G., Donohoe, B., Knoshaug, E. P. (2012). *Enzymatic cell wall degradation of Chlorella vulgaris and other microalgae for biofuels production*. Planta, 237(1), 239–253
- Ghribi, A.M., Gafsi, I.M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Besbes, S. (2015) *Effect of drying methods on physicochemical and functional properties of chickpea protein concentrates*. J Food Eng 165:179–188
- Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I., Empis, J. (2005). *Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions*. Eur Food Res Technol, 222:362–7
- Gunerken, E., D’Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H. (2015) *Cell disruption for microalgae biorefineries*, Biotechnol. Adv., 33, pp. 243-260
- Gupte, Y., Iyer, G. (2015). *Biodiversity of Euglenophyta in Thane District*
- Hackett, J.D., Anderson, D.M., Erdner, D.L., Bhattacharya, D. (2004). Am. J. Bot., 91
- Heimann, K., Huerlimann, R. (2015). *Microalgal Classification. Handbook of Marine Microalgae*, 25–41
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. (2008). *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*. Plant J;54:621–39
- Ibanoglu, E. (2005). *Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins*. Food Chem 90:621–626
- Kristiansen, J., Skaloud, P. (2016) *Chrysophyta*
- Kuchitsu, K., Oh-hama, T., Tsuzuki, M., Miyachi, S. (1987). *Detection and characterization of acidic compartments (vacuoles) in Chlorella vulgaris 11 h cells by ³¹P-in vivo NMR spectroscopy and cytochemical techniques*. Arch Microbiol;148:83–7

- Kumar, H.D., Singh, H.N. (1979). *Xanthophyta*, A Textbook on Algae, Macmillan Education UK, London
- Lam, M.K., Lee, K.T., (2015). *Bioethanol Production from Microalgae*, Handbook of Marine Microalgae, 197-208
- Lander, R., Manger, W., Scouloudis, M., Ku, A., Davis, C., Lee, A. (2000). *Gaulin homogenization, a mechanical study*. Biotechnol. Prog. (1), 80-85
- Lawrenz, E., Fedewa, E.J., Richardson, T.L. (2011) *Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts*, J. Appl. Phycol., 23, pp. 865-871
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). *Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review*. Algal Research, 12, 497–512
- Lee, R.E. (2008). *Phycology*. 4th ed. Cambridge, England; New York: Cambridge University Press
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., Oh, Y.-K. (2017). *Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review*. Bioresource Technology, 244, 1317–1328
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J. (2015). *Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels*, J. Appl. Phycol., 27, pp. 1881-1889
- Lee, I., Han, J.I. (2013). *The effects of waste-activated sludge pretreatment using hydrodynamic cavitation for methane production*, Ultrason. Sonochem., 20, pp. 1450-1455
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001). *Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, F4.3.1
- Maistro, S., Broady, P., Andreoli, C., Negrisolo, E. (2016). *Xanthophyceae*, Handbook of the Protists, Springer International Publishing, Cham
- Martinez, F., Ascaso, C., Orus, M.I. (1991). *Morphometric and stereologic analysis of Chlorella vulgaris under heterotrophic growth conditions*. Ann. Bot. 67, 239-245
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review*. Renew Sustain Energy Rev;14:217–32
- Maxfield, F. R. (2002). *Plasma membrane microdomains*. Current Opinion in Cell Biology, 14(4), 483–487
- McCauley, L.A.R., Wehr, J.D. (2007). *Phycologia*, 46, pp. 429-439
- Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., Morais, R. (2001). *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 19–24.

- Mendes-Pinto, M.M., Raposo, M.F.J., Bowen, J., Young, A.J., Morais, R. (2001). *Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of Haematococcus pluvalis: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability*. J. Appl. Phycol. 13, 19-24
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., Gouveia, L. (2012). *Pre-treatment optimization of Scenedesmus obliquus microalga for bioethanol production*. Bioresource Technology, 104, 342–348
- Myklestad, S.M., Granum, E. (2009). *Biology of (1,3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromistans*, Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides, Elsevier
- Nasirpour, N., Mousavi, S.M., Shojaosadati, S.A. (2014). *A novel surfactant-assisted ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis*, Bioresour. Technol., 169, 33-37
- Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H., Sim, S.J. (2009). *Hydrothermal acid pretreatment of Chlamydomonas reinhardtii biomass for ethanol production*. J. Microbiol. Biotechnol. 19 (2), 161-166
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Rios, S., Rey, M., Lorente, E., Farriol, X., Salvado, J. (2014). *Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation*, Bioresour. Technol., 163, pp. 136-142
- Ogawa, K., Ikeda, Y., Kondo, S. (1999). *A new trisaccharide, α -D-glucopyranuronosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranose from Chlorella vulgaris*. Carbohydr Res;321:128–31
- Olmstead, I.L.D., Kentish, S.E., Scales, P.J., Martin, G.J.O. (2013). *Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass*, Bioresour. Technol., 148, pp. 615-619
- Praveenkumar, R., Lee, K., Lee, J., Oh, Y.K. (2015) *Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae*, Green Chem., 17, pp. 1226-1234
- Priyadarshani, I., Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae—A review*, J Algal Biomass- Utln, 3, pp. 89-100
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., Rashid, N. (2018). *Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 92, 394–404
- Safi, C., Olivieri, G., Campos, R. P., Engelen-Smit, N., Mulder, W. J., van den Broek, L. A. M., & Sijtsma, L. (2017). *Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration*. Bioresource Technology, 225, 151–158
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2014). *Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods*. Algal Research, 3, 61–65

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2014). *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278
- Scoble, J.M., Cavalier-Smith, T. (2014). *Eur. J. Protistol.*, 50, pp. 551-592
- Smith, D.M., Nielsen, S.S. (2010). *Protein separation and characterization procedures*. In: Heldman DR (ed) *Food analysis*. Springer, Berlin, pp 261–281
- Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W. (1999). *Biology*. 5th ed.. Fort Worth: Saunders College Publishing
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). *Commercial applications of microalgae*, *J Biosci Bioeng*, 101, pp. 87-96
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G. (2009). *Influence of nitrogen limitation regime on the production by Chlorella vulgaris of lipids for biodiesel feedstocks*. *Biofuels*;1:47–58
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H., Renganathan, S. (2016). *Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach*, *Renew Sustain Energy Rev*, 55, pp. 909-941
- Takeda, H. (1988). *Classification of Chlorella strains by cell wall sugar composition*. *Phytochemistry*;27:3823–6, 16:367–71
- Takeda, H. (1991). *Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae)1*. *J Phycol*;27:224–32
- Takeda, H., Hirokawa, T. (1984). *Studies on the cell wall of Chlorella V. Comparison of the cell wall chemical compositions in strains of Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol*;25:287–95
- Taleb, A., Kandilian, R., Touchard, R., Montalescot, V., Rinaldi, T., Taha, S., Takache, H., Marchal, L., Legrand, J., Pruvost, J. (2016). *Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production*, *Bioresour. Technol.*, 218 pp. 480-490
- The Editors of Encyclopaedia. (2020). *Euglena*, *Encyclopedia Britannica*
- Ursu, A.V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., Michaud, P. (2014). *Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157, 134–139
- Van den Hoek, C, Mann, D, Jahns, H. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press
- Von der Heyden, S., Chao, E., Cavalier-Smith, T. (2004). *Eur. J. Phycol.*, 39, pp. 343-350

- Waghmare, A. G., Salve, M. K., LeBlanc, J. G., Arya, S. S. (2016). *Concentration and characterization of microalgae proteins from Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1)
- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S. (2004). *Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)*. *J Plant Res*;117:257–64
- Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S. (2005). *Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, Parachlorella kessleri (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)*. *Planta*;221:766–75
- Yeh, K.L., Chang, J.S. (2011). *Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: implications for biofuels*. *Biotechnol J*;6:1358–66
- Yoon, H.S., Nelson, W., Lindstrom, S.C., Boo, S.M., Poeschel, C., Qiu, H., Bhattacharya, D. (2017) *Rhodophyta*, *Handbook of the Protists (Second edition)*, Springer International Publishing, pp. 89-133
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C. (2011). *Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves*. *Appl Biochem Biotechnol*;164:1215–24
- Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., Steyer, J.P. (2020). *Microalgae Cultivation Systems. Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 11–29