

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας II: Ανάπτυξης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και  
Συστημάτων

Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς



Διπλωματική Εργασία

**Ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από φύκη με χρήση  
υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub>**

**Δημοσθένης Ασπρούδης**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Επαμεινώνδας Βουτσάς

**Αθήνα, 2023**



National Technical University of Athens  
School of Chemical Engineering

Section II: Department of Process Analysis and Plant Design

Thermodynamics and Transport Phenomena Laboratory



Diploma Thesis

**Recovery of bioactive compounds from algae using  
supercritical CO<sub>2</sub>**

**Dimosthenis Asproudis**

Supervisor Professor:  
Epaminondas Voutsas

**Athens, 2023**

## Ευχαριστίες

Με την συγγραφή των επόμενων παραγράφων έρχεται το τέλος ενός από των σημαντικότερών μου κεφαλαίων. Φτάνει στο τέλος της μια πενταετία γεμάτη πολλά συναισθήματα, θετικά και αρνητικά, πολλή σκληρή δουλειά και πολλή διασκέδαση. Η σχολή των Χημικών Μηχανικών εκτός από τις πολύπλευρες επιστημονικές γνώσεις που μου πρόσφερε, με βοήθησε να αναπτυχθώ και σαν άνθρωπος, καθώς μου παρέδωσε πολλές σημαντικές αξίες, όπως αυτή της πειθαρχίας, την οποία την θεωρώ μια από τις σημαντικότερες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την κάρδια μου τον επιβλέπων καθηγητή μου Επαμεινώνδα Βουτσά. Καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών παρακολούθησα όλα τα μαθήματα που δίδασκε, καθώς μου κέντρισε το ενδιαφέρον το αντικείμενο με το οποίο ασχολείται και το πόσο μεταδοτικός και επικοινωνιακός καθηγητής είναι. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βίκη Λούλη (ΕΔΙΠ), η οποία με βοήθησε στα μέγιστα τόσο στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής όσο και στην συγγραφή της. Ήταν πάντα εκεί για την επίλυση των αποριών μου καθώς και για την σωστή καθοδήγηση.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, υποψήφιους διδάκτορες και μη και διπλωματικούς, για το εξαιρετικό περιβάλλον που υπήρχε. Το εύχαριστο κλίμα που επικρατούσε, οι συνεργασίες και οι ανιδιοτελείς βοήθειες καθώς και οι πλάκες μεταξύ μας ήταν κάτι το οποίο βοήθησε πάρα πολύ ψυχολογικά στην σύναψη αυτής της διπλωματικής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που πέρασαν αυτά τα 5 χρόνια από την ζωή μου και με δίδαξαν με τον τρόπο τους κάτι.

Τέλος, ένα ευχαριστώ είναι πολύ λίγο για την μητέρα μου Νίτσα, η οποία δεν είναι πλέον εν ζωή και δεν κατάφερε να δει όλο αυτό το έργο να ολοκληρώνεται. Ομοίως για την οικογένειά μου, για τους καλύτερους μου φίλους, Δημήτρη και Αναστάση και για την παρέα μου από την σχολή, οι οποίοι ήταν πάντα εκεί στις δυσκολότερες στιγμές της ζωής μου και με βοήθησαν να σταθώ στα πόδια μου και να ορθοποδήσω ξανά.

## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>Εισαγωγή</b> .....	<b>14</b>
<b>Θεωρητικό Μέρος</b> .....	<b>16</b>
Μακροάλη (Seaweeds).....	16
Είδη Μακροαλγών.....	17
Βιοδραστικά Συστατικά.....	18
Λιπαρά οξέα.....	18
Στερόλες.....	18
Πολυσακχαρίτες.....	19
Άγαρ.....	19
Το μακροάλγος Ulva.....	19
Βιοδραστικά Συστατικά της Ulva.....	20
Εφαρμογές Ulva.....	21
Μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών.....	22
Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης.....	22
Νέες «πράσινες» μέθοδοι εκχύλισης.....	23
Υπερκρίσιμη Τεχνολογία.....	23
Υπερκρίσιμα ρευστά.....	23
Υπερκρίσιμη εκχύλιση.....	25
Πλεονεκτηματα – Μειονεκτηματα.....	27
Εφαρμογές Υπερκρίσιμης εκχύλισης – Υπερκρίσιμων ρευστών.....	28
Ανάλυση εκχυλισμάτων.....	29
Αντιοξειδωτική δράση.....	29
Θεωρητικό υπόβαθρο.....	29
Συντελεστής αντιοξειδωτική δράσης IC50.....	30
Μέθοδος DPPH.....	30
Φαινολικά Θεωρία.....	31
Φαινολικές ενώσεις.....	31
Μέθοδος Folin–Ciocalteu.....	31
Χλωροφύλλη.....	31
Καροτενοειδή.....	32

Πειραματικός Σχεδιασμός.....	33
<b>Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>35</b>
Πρώτη ύλη .....	35
Άλεση και Κοκκομετρική ανάλυση .....	35
Αποθήκευση .....	35
Συσκευή Υ.Ε.....	36
Διαδικασία πειράματος .....	39
Εκκίνηση πειράματος:.....	39
Κλείσιμο συσκευής:.....	40
Καθαρισμός συσκευής: .....	40
Εξάτμιση.....	41
Συμβατική εκχύλιση .....	42
Ανάλυση εκχυλισμάτων .....	43
Προσδιορισμός αντιοξειδωτική δράσης .....	43
Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού περιεχομένου .....	44
Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών .....	46
Σχεδιασμός πειραμάτων .....	47
Αποτελέσματα – Σχολιασμός .....	49
Πειράματα SFE.....	49
Απόδοση εκχύλισης.....	49
Αντιοξειδωτική δράση.....	52
Συγκέντρωση φαινολικών οξέων .....	54
Συγκέντρωση Καροτενοειδών.....	55
Συγκέντρωση χλωροφυλλών .....	57
Συν - διαλύτης.....	59
Πείραμα συμβατικής εκχύλισης .....	60
Μοντελοποίηση Αποτελεσμάτων – Στατιστική Ανάλυση.....	61
Απόδοση .....	61
Καροτενοειδή.....	62
Χλωροφύλλες .....	64

<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>66</b>
<b>Προτάσεις για το μέλλον.....</b>	<b>68</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>69</b>

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Πράσινα μακροάλη [3].....	16
Εικόνα 2. Τα τρία είδη μακροαλγών από αριστερά προς τα δεξιά: Πράσινο, Καφέ, Κόκκινο [6] [7] [8] .....	17
Εικόνα 3. Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) [9].....	18
Εικόνα 4. Στερόλη [10] .....	18
Εικόνα 5. Θαλάσσιο φύκος <i>Ulva sensu lato</i> [11].....	20
Εικόνα 6. Πολυσακχαρίτες <i>Ulvan</i> [12].....	21
Εικόνα 7. Πειραματική διάταξη Soxhlet.....	22
Εικόνα 8. Διάγραμμα φάσεων καθαρής ουσίας [23] .....	24
Εικόνα 9. Διάγραμμα ροής Υ.Ε.....	26
Εικόνα 10. Αντίδραση αντιοξειδωτικών με την ρίζα του DPPH [45].....	30
Εικόνα 11. Βασική δομή φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών [47] .....	31
Εικόνα 12. Λουτεΐνη [53].....	32
Εικόνα 13. Κύβος για 2 <sup>3</sup> παραγοντικό σχεδιασμό.....	33
Εικόνα 14. Αριστερά συσκευή άλεσης και δεξιά η συσκευή κοσκίνισης.....	35
Εικόνα 15. Εργαστηριακή συσκευή Υ.Ε .....	36
Εικόνα 16. Διάγραμμα ροής Υ.Ε [56] .....	37
Εικόνα 17. Πειραματική διάταξη για χρήση συν - διαλύτη .....	38
Εικόνα 18. Παραλαβή εκχυλίσματος με αιθανόλη από τον καθαρισμό .....	41
Εικόνα 19. Εξατμιστήρας για την απομάκρυνση αιθανόλης.....	41
Εικόνα 20. Πειραματική διάταξη συμβατικής εκχύλισης .....	42
Εικόνα 21. Από αριστερά προς τα δεξιά (με αύξουσα σειρά) οι αραιώσεις για το πείραμα του συν - διαλύτη .....	43
Εικόνα 22. Αντίδραση αντιοξειδωτικών με DPPH μετά από 30' .....	44



## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Κρίσιμες πιέσεις και θερμοκρασίες για μερικούς υπερκρίσιμους διαλύτες [27]	25
Πίνακας 2. Πίνακας δοκιμών	34
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά μεγέθη συσκευής Υ.Ε	37
Πίνακας 4. Πίνακας διαγράμματος ροής [56]	38
Πίνακας 5. Συγκεντρωτικό πίνακας όλων των πειραμάτων Υ.Ε	47
Πίνακας 6. Κεντρικά πειράματα Υ.Ε	48
Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας πειραμάτων	49
Πίνακας 8. Αποτελέσματα πειράματος συν - διαλύτη	59
Πίνακας 9. Αποτελέσματα πειράματος συμβατικής εκχύλισης	60
Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο της απόδοσης	61
Πίνακας 11. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο της απόδοσης	61
Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο των καρτενοειδών	62
Πίνακας 13. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο των καρτενοειδών	62
Πίνακας 14. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο των χλωροφυλλών	64
Πίνακας 15. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο των χλωροφυλλών	64

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος .....	45
Διάγραμμα 3. Επίδραση πίεσης στην απόδοση.....	50
Διάγραμμα 4. Επίδραση θερμοκρασίας στην απόδοση.....	51
Διάγραμμα 5. Επίδραση ροής στην απόδοση.....	51
Διάγραμμα 6. Επίδραση πίεσης στον IC50 .....	52
Διάγραμμα 7. Επίδραση θερμοκρασίας στον IC50 .....	53
Διάγραμμα 8. Επίδραση ροής στον IC50 .....	53
Διάγραμμα 9. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση Φαινολικών .....	54
Διάγραμμα 10. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση φαινολικών .....	55
Διάγραμμα 11. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση φαινολικών.....	55
Διάγραμμα 12. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση καροτενοειδών.....	56
Διάγραμμα 13. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση καροτενοειδών.....	56
Διάγραμμα 14. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση καροτενοειδών .....	57
Διάγραμμα 15. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση χλωροφυλλών .....	57
Διάγραμμα 16. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση χλωροφυλλών .....	58
Διάγραμμα 17. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση χλωροφυλλών .....	58
Διάγραμμα 18. Διάγραμμα προβλεπόμενων τιμών έναντι πειραματικών.....	62
Διάγραμμα 19. Διάγραμμα προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών για τα καροτενοειδή .....	63
Διάγραμμα 20. Διάγραμμα προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών για τις χλωροφύλλες .....	65

## Περίληψη

Η Ulva είναι ένα μακροάλγος το οποίο τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει ιδιαίτερη προσοχή από την παγκόσμια επιστομονική κοινότητα. Ο λόγος είναι τα πλούσια βιοδραστικά συστατικά της, τα οποία της προσδίδουν μοναδικές ιδιότητες, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές κ.α. Έτσι λοιπόν βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε τομείς όπως είναι τα τρόφιμα, τα φάρμακα και η κοσμητολογία. Ακόμη, είναι πολλά υποσχόμενη η χρήση της για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (ΥΕ) αποτελεί μια «πράσινη» μέθοδο εκχύλισης, η οποία μελετάται εδώ και πολλά χρόνια και αποτελεί μια διεργασία που μπορεί να αντικαταστήσει έως έναν βαθμό τις παραδοσιακές συμβατικές μεθόδους. Ως διαλύτης στην ΥΕ χρησιμοποιείται συνήθως το CO<sub>2</sub>, το οποίο είναι μη τοξικό, μη εύφλεκτο και φιλικό προς το περιβάλλον. Επίσης λόγω της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας του, η διεργασία γίνεται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα να μην καταστρέφονται τα θερμοευαίσθητα συστατικά.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της εκχύλισης του μακροάλγους Ulva, με χρήση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub>. Ειδικότερα, μελετάται η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας και της ροής του CO<sub>2</sub>, στην απόδοση, στην αντιοξειδωτική δράση, στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στις συγκεντρώσεις χλωροφυλλών και καροτενοειδών. Επίσης, πραγματοποιείται μοντελοποίηση της διεργασίας και στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Οι πιέσεις που μελετήθηκαν ήταν 100, 175 και 250 bar, οι θερμοκρασίες 40, 50 και 60 °C και η ροή του διαλύτη 1, 1.75 και 2.5 kg CO<sub>2</sub>/h. Επίσης μελετήθηκε και η επίδραση της προσθήκης συν – διαλύτη, ώστε να επιτευχθούν καλύτερες αποδόσεις και ποιοτικότερα εκχυλίσματα. Ως συν – διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη σε ποσοστό 10%κ.β.

Ως προς την ανάλυση των εκχυλισμάτων, η αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκε με την βοήθεια του παράγοντα αντιοξειδωτικής δράσης IC<sub>50</sub>, ο οποίος υπολογίζεται με την μέθοδο της ελεύθερης ρίζας DPPH. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε με την μέθοδο Folin – Ciocalteu και οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά.

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες έχουν θετική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης αλλά και στην ποιότητα των εκχυλισμάτων. Ειδικότερα βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες ήταν στα 250 bar, 60°C και 1 kg /h. Μετρήθηκε απόδοση 10.2 %, IC<sub>50</sub> = 31.56 mg<sub>εκχ</sub>/mL συγκέντρωση φαινολικών ίση με 1.43 mg<sub>GAE</sub> / g<sub>βιομάζας</sub>, συγκέντρωση καροτενοειδών ίση με 1.10 mg/g<sub>βιομάζας</sub> και συγκέντρωση χλωροφυλλών 6.34 mg/g<sub>βιομάζας</sub>. Ακόμα, η χρήση συν – διαλύτη οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης και της δραστικότητας των εκχυλισμάτων.

Τέλος, στο κομμάτι της μοντελοποίησης και της στατιστικής ανάλυσης, αναπτύχθηκαν αξιόπιστα μοντέλα για την απόδοση, τα καροτενοειδή και τις χλωροφύλλες, ενώ δεν βρέθηκε καλή συσχέτιση για την αντιοξειδωτική δράση και τα φαινολικά. Οι επιδράσεις της πίεσης και της θερμοκρασίας και στα 3 μοντέλα φάνηκαν να είναι αυτές που έχουν πρωταρχικό ρόλο.

Συμπερασματικά, η χρήση της υπερκρίσιμης εκχύλισης για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από μακροάλη αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πράσινη μέθοδο, ιδιαίτερα με την προσθήκη μικρού ποσοστού συνδιαλύτη.

## Abstract

Ulva is a macroalgae which has received special attention from the scientific community in recent years. This is due to its bioactive components which have anticancer, antioxidant, antibacterial etc. properties. This way, it has a wide range of uses in food, drug and cosmetic industry. It is also a promising biomass for the the production of biofuels.

Supercritical Fluid Extraction (SFE) is a "green" extraction method that has been studied for many years, and is a process that can replace traditional conventional methods to a certain degree. In the case of SFE, CO<sub>2</sub> is usually used as a solvent which is non toxic, non flammable and environmentally friendly. Because of its low critical temperature, the process is also carried out at relatively low temperatures and thus thermal degradation of thermolabile components is avoided.

The purpose of this thesis is to study the extraction of the macroalgae Ulva, using supercritical CO<sub>2</sub>. Specifically, the effect of pressure, temperature and CO<sub>2</sub> flow rate is studied, on the yield, the antioxidant activity, the total phenolic content and the chlorophyll and carotenoid concentrations in the extract. Also, modeling of the process and statistical analysis of the experimental results were carried out.

The pressures investigated were 100, 175 and 250 bar, the temperatures 40, 50 and 60 °C and the solvent flow was 1.75 and 2.5 kg CO<sub>2</sub> per hour. In order to obtain higher yields and improve the quality of extract, use of ethanol as co - solvent was also studied at a percentage of 10% by weight-

As regards the analysis of extracts, the antioxidant activity factor, IC<sub>50</sub>, calculated using a DPPH Free Radical Method, has been used to study the Antioxidant Activity. The Folin Cioalciu method was used to calculate the total content of phenols, and spectrophotometrical measurements were carried out to measure the chlorophyll and carotenoid concentrations.

According to the experimental results, both extraction yield and quality of extracts were positively affected by higher extraction pressures and temperatures. The optimum conditions were found to be 250 bar, 60°C and 1 kg/h. A yield of 10.2 %, IC<sub>50</sub> = 31.56 mg<sub>extr</sub>/mL, phenolic concentration equal to 1.43 mg<sub>GAE</sub> / g<sub>biomass</sub>, carotenoid concentration equal to 1.10 mg/g<sub>biomass</sub> and chlorophyll concentration 6.34 mg/g<sub>biomass</sub> were measured at these conditions. Furthermore, it was found that the use of a co – solvent affected positively the extract yield and activity.

Finally, reliable models have been developed for the yield and the concentrations of carotenoids and chlorophylls, as a function of process parameters using proper statistical methods. Unfortunately, no good correlation was established for IC<sub>50</sub> and phenolic content. In all three models, the influence of temperature and pressure was found to play the most important role.

All in all, this work proved that the use of supercritical extraction for the recovery of bioactive compounds from macroalgae seems to be very promising, particularly when a small amount of co-solvent is employed.



## Εισαγωγή

Στο κατώφλι του 21<sup>ου</sup> αιώνα, η αλόγιστη υποβάθμιση και καταστροφή του περιβάλλοντος προχωράει με γοργούς ρυθμούς. Αυτό έχει σαν αντίκτυπο την άμεση καταστροφή της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και γενικά των οικοσυστημάτων. Είναι επομένως επιτακτική ανάγκη η ελάττωση χρήσης ουσιών και η ελάττωση διεξαγωγής διεργασιών, οι οποίες είναι τοξικές και επικίνδυνες για το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό οι βιομηχανικές εγκαταστάσεις είναι υποχρεωμένες να βρουν μεθόδους οι οποίες θα μειώσουν τους κινδύνους μόλυνσης του περιβάλλοντος, δεν θα καταναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας και δεν θα αφήνουν κάποιο τοξικό αποτύπωμα τόσο στο περιβάλλον όσο και στα προϊόντα των διεργασιών.

Τη λύση για την εύρεση τέτοιων μεθόδων έρχεται να δώσει η «Πράσινη Τεχνολογία». Ειδικότερα, πρόκειται για μεθόδους και διεργασίες οι οποίες μπορούν να αντικαταστήσουν εξ' ολοκλήρου ή σε έναν βαθμό, τις αντίστοιχες τοξικές και να προσφέρουν διαδικασίες και προϊόντα τα οποία θα αφήνουν όσο το δυνατόν μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Στο κομμάτι των εκχυλίσεων, η βιομηχανία έχει υιοθετήσει «πράσινες» εκχυλιστικές μεθόδους, οι οποίες βρίσκονται σε θέση να πάρουν τη θέση των παραδοσιακών συμβατικών μεθόδων, δηλαδή της απόσταξης, της εκχύλισης με κάποιο οργανικό διαλύτη κ.α.

Μια πολλά υποσχόμενη «πράσινη» μέθοδος εκχύλισης, είναι η Υπερκρίσιμη Εκχύλιση κατά την οποία πραγματοποιείται εκχύλιση με την βοήθεια υπερκρίσιμων διαλυτών. Ο πιο διαδεδομένος διαλύτης είναι το CO<sub>2</sub> το οποίο σε υπερκρίσιμες συνθήκες παρουσιάζει καλή διαλυτική ικανότητα, είναι μη τοξικό, μη εύφλεκτο, εύκολα διαθέσιμο, χαμηλού κόστους και μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από το εκχύλισμα. Λόγω του τελευταίου, τα εκχυλίσματα θεωρούνται «φυσικά» καθώς δεν έχουν κάποιο υπόλειμμα από τον διαλύτη. Επιπλέον, λόγω της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας του, η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα τα θερμοευαίσθητα εκχυλίσματα να μην αλλοιώνονται. Ακόμη μπορεί να πραγματοποιηθεί ανακύκλωση του CO<sub>2</sub>, γεγονός πολύ θετικό καθώς δεν απορρίπτεται στην ατμόσφαιρα.

Η παραπάνω διεργασία είναι ευρέως διαδεδομένη και συνδυάζεται αρκετά με τον τομέα των μικροαλγών και μακροαλγών. Ειδικότερα τα τελευταία, γίνονται πόλος έλξης λόγω των λιπιδίων τους, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα των βιοκαυσίμων. Ένα τέτοιο μακροάλγος είναι η *Ulva*, η οποία βρίσκει πολλές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων και των βιοκαυσίμων. Συγκεκριμένα, μπορεί να καταναλωθεί ως τροφή, το οποίο συνηθίζεται στις Ασιατικές χώρες, και χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Επίσης, τα εκχυλίσματα της χρησιμοποιούνται στον τομέα των φαρμάκων, της κοσμητολογίας αλλά και στην γεωργία. Περιέχει πλούσια βιοδραστικά συστατικά, όπως ο πολυσακχαρίτης *Ulvan*, που της προσφέρουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές ιδιότητες.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιείται μελέτη ορισμένων συνθηκών λειτουργίας (Πίεση, Θερμοκρασία, Ροή CO<sub>2</sub>) της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης με CO<sub>2</sub> για την παραλαβή βιοδραστικών ουσιών από το μακροάλγος *Ulva*, μια διεργασία που για το συγκεκριμένο φύκος έχει ελάχιστα μελετηθεί. Εξετάζεται η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας και της ροής στην απόδοση, στον συντελεστή αντιοξειδωτικής δράσης IC<sub>50</sub>, στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και στις συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών και των

καροτενοειδών (TCC). Για τον σχεδιασμό των πειραμάτων, εφαρμόστηκε παραγοντικός σχεδιασμός 3 παραγόντων (A,B,C) σε δύο επίπεδα, ένα υψηλό και ένα χαμηλό, με ένα κεντρικό σημείο (4 επαναλήψεις) και ακολούθησε στατιστική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) των αποτελεσμάτων, οδηγώντας την ανάπτυξη συσχετίσεων μεταξύ των λειτουργικών παραμέτρων και των εξεταζόμενων αποκρίσεων. Τέλος, εξετάσθηκε και η χρήση ενός πολικού συνδιαλύτη, της αιθανόλης (EtOH), ώστε να εξεταστεί και η επίδραση αυτού στην απόδοση της διεργασίας και την ποιότητα του εκχυλίματος.



## Θεωρητικό Μέρος

### Μακροάλη (Seaweeds)

Τα μακροάλη είναι μακροσκοπικά πολυκύτταρα θαλάσσια φύκια που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα σε σχετικά ρηχά παράκτια νερά, σε βαθιές θαλάσσιες περιοχές βάθους έως και 180 μέτρα αλλά και σε εκβολές ποταμών πάνω σε πέτρες, νεκρά κοράλλια, βότσαλα κ.α. [1]

Έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς, όπως για διατροφικές, φαρμακευτικές, βοτανικές και άλλες χρήσεις. Παρόλο που η θεραπευτική τους ιδιότητα είναι γνωστή εδώ και πολλούς αιώνες, η επιστημονική έρευνα για αυτά ξεκίνησε την δεκαετία του 1970. Συγκεκριμένα αποτελούν πηγή για την παραγωγή χημικών ενώσεων όπως το άγαρ – άγαρ, η καραγενάνη και τα αλγινικά. Αυτές ονομάζονται φυτοχημικές ενώσεις και προορίζονται κυρίως για ανθρώπινη και ζωϊκή κατανάλωση και για λίπασμα. Ακόμα χρησιμοποιούνται ευρέως και σε βιομηχανίες τροφίμων, κλωστοϋφαντουργίες, βιομηχανίες χαρτιού κ.α. [1]

Τα εκχυλίσματα των μακροαλγών είναι εξίσου ένα πολύ σημαντικό συστατικό των προϊόντων που βρίσκονται στην αγορά και είναι πλούσια σε πολυσακχαρίτες, μέταλλα και ορισμένες βιταμίνες. Τα οφέλη τους είναι πάρα πολλά και τα τελευταία χρόνια έχουν κινήσει περισσότερο το ενδιαφέρον λόγω των βιοδραστικών ουσιών τους, όπως των πολυσακχαριτών, των λιπιδίων και των πολυφαινόλων [1]. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από 60 % υδατάνθρακες, 10 – 47 % από πρωτεΐνες και 1 – 3 % από λιπίδια [2]. Οι ιδιότητες τους είναι αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντι – ιικές. Τα ποιοτικότερα, προέρχονται από τα καφέ φύκια *Ascophyllum nodosum*, τα οποία προέρχονται από τα πλούσια νερά της Νορβηγίας και του Καναδά. [1]

Αναλυτικά οι βιοδραστικές ουσίες θα αναφερθούν παρακάτω.



Εικόνα 1. Πράσινα μακροάλη [3]

Ωστόσο είναι σημαντικό να ανφερθεί ότι η κατανάλωση τους χρειάζεται προσοχή λόγω της τοξικότητάς τους. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα είδη μαρκοφυκίων περιέχουν τοξικές ουσίες, βακτήρια και επικίνδυνα άνθη καθώς απορροφούν βαρέα μέταλλα από το θαλασσινό νερό. Η ύπαρξη σε μεγάλο βαθμό των συγκεκριμένων ουσιών μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς αλληλεπιδράσεις με φάρμακα και με τις ορμόνες στο ανθρώπινο σώμα. [4]

## Είδη Μακροαλγών

Υπάρχουν περίπου 6000 είδη μακροαλγών τα οποία κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με το χρώμα τους (Εικόνα 2):

- Πράσινα μακροάλγη (Chlorophyta): Συναντιούνται σε συνηθισμένα οικοσυστήματα αλμυρών και γλυκών νερών. Το πράσινο χρώμα τους προέρχεται από την έντονη παρουσία χλωροφυλλών α και β και συνήθως είναι τροφή για κάποια ζώα.
- Καφέ μακροάλγη (Phaeophyceae): Το χρώμα τους προέρχεται από την παρουσία πράσινων χρωστικών (χλωροφύλλη α και γ) και από την καφέ ουσία φουκοξανθίνη και παράγουν ένα μοναδικό τύπο αμύλου, την Λαμιναρίνη. Τέλος, σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα Κέλπη, που ονομάζονται και μπαμπού της θάλασσας (Sea Bamboo).
- Κόκκινα μακροάλγη (Rhodophyta): Χιλιάδες από αυτά συναντιούνται σε ζεστά νερά, όπως στις ακτές της Νότιας Αφρικής και αποτελούνται από κόκκινες και μπλε χρωστικές. Περιέχουν χλωροφύλλες α και δ και το χρώμα τους προέρχεται από την παρουσία της Φυτοερυθρίνης (χρωστική) στα κύτταρα τους. Αναπτύσσονται και σε μικρά και σε μεγάλα βάθη και είναι πηγή άγαρ, το οποίο είναι ένα υποκατάστατο του τζελ που χρησιμοποιείται στην ζαχαροπλαστική. [1] [5]



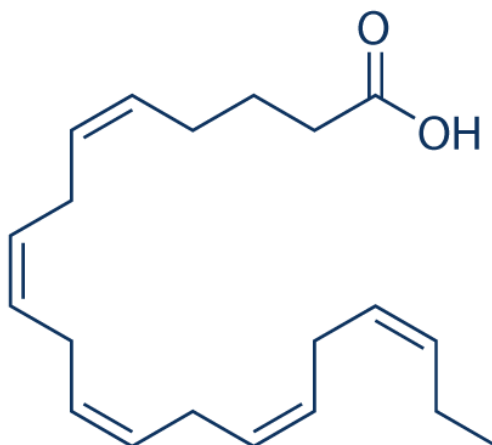
Εικόνα 2. Τα τρία είδη μακροαλγών από αριστερά προς τα δεξιά: Πράσινο, Καφέ, Κόκκινο [6] [7] [8]

## Βιοδραστικά Συστατικά

Όπως τα φυτά, έτσι και τα άγλη χρησιμοποιούν παρόμοιες στρατηγικές για να αμυνθούν στα αρπακτικά και στα παράσιτα. Επίσης έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να επιβιώνουν από πολλές απειλές όπως βακτήρια, ιούς κ.α. Όλα τα προηγούμενα συν το γεγονός ότι έχουν μάθει να ζουν σε εχθρικά οικοσυστήματα τα οποία παρουσιάζουν απότομες μεταβολές θερμοκρασίας, έκθεση σε ακτινοβολίες UV κ.α., τα έχουν ωθήσει στην ανάπτυξη πληθώρας βιοδραστικών ενώσεων, οι οποίες αναλύονται στη συνέχεια [5].

### Λιπαρά οξέα

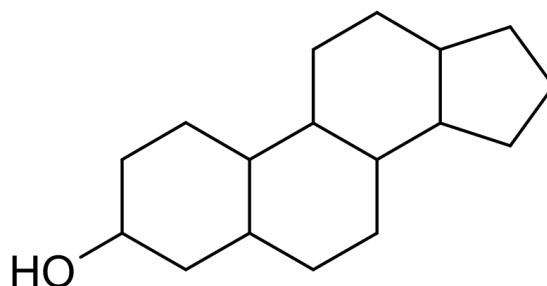
Τα λιπαρά οξέα βοηθούν στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και τώρα έχουν εισαχθεί σε διαφορούς τομείς όπως η βιοϊατρική και η διατροφολογία. Χρησιμοποιούνται περισσότερο στον δυτικό κόσμο κατά της παχυσαρκίας και των καρδιαγγειακών προβλημάτων. Τα θαλάσσια φύκια αποτελούν πηγή των EPA (Eicosapentaenoic acid) (Εικόνα 3), τα οποία είναι μια οικογένεια ω – 3 λιπαρών οξέων, που βοηθάνε στη μεταφορά του οξυγόνου και των ηλεκτρονίων.



Εικόνα 3. Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) [9]

### Στερόλες

Οι στερόλες είναι το κύριο διατροφικό συστατικό που βρίσκεται στα φύκια και το σημαντικότερο των μικροαλγών. Συναντιέται στα φυτά, στα ζώα και στους μύκητες με την πιο γνωστή στερόλη να είναι η χοληστερόλη. Η συγκεκριμένη είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική λειτουργία και επηρεάζει την ρευστότητα της ζωικής κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 4. Στερόλη [10]

## Πολυσακχαρίτες

Η παρουσία των πολυσακχαριτών στα μακροάλη είναι μεγάλη. Για παράδειγμα, το 65 % της Ulva απαρτίζεται από πολυσακχαρίτες. Τα κυτταρικά τοιχώματα τους αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και το ποσοστό των τελευταίων κυμαίνεται από 2 % - 10%.

## Άγαρ

Το άγαρ είναι ένα μείγμα πολυσακχαριτών που αποτελούνται κυρίως από αγαρόζη και αγροπηκτίνη. Λόγω της ιδιαίτερης συμπεριφοράς του ως τζελ και λόγω του ιξώδους του, χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς στη βιομηχανία. Το χαμηλής ποιότητας άγαρ βρίσκεται εφαρμογές στο φαγητό όπως στα ζαχαρωτά, στους χυμούς φρούτων κ.α. Το υψηλότερης ποιότητας χρησιμοποιείται σε φάρμακα, στη βιολογία για τεχνικές διαχωρισμού κ.α. Τέλος, μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και διακόπτει την συσσώρευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Υπάρχουν και άλλες σημαντικές βιοδραστικές ουσίες όπως τα καροτενοειδή που αναλύονται σε επόμενα κεφάλαια, οι διαιτητικές ίνες, η καραγεγάνη κ.α. [1]

Αν και ακόμα υπάρχουν πολλά να ερευνηθούν για αυτά τα θαλάσσια φύκια, είναι γνωστό ότι οι παραπάνω ουσίες μπορούν να βρουν εφαρμογή σε τομείς όπως η φαρμακευτική, τα καλλυντικά και τα τρόφιμα. Αυτό έχει ως συνέπεια η ζήτηση τους να αυξάνεται συνεχώς με αποτέλεσμα να αναφέρεται ότι το κόστος τους το 2024 θα είναι διπλάσιο από αυτό του 2017. [5]

## Το μακροάλγος Ulva

Η Ulva, ένα πράσινο μακροάλγος το οποίο ανήκει στο γένος *Chlorophyta*, ανακαλύφθηκε από τον Linnaeus στην Βαλτική θάλασσα τον 17<sup>ο</sup> αιώνα. Αναπτύσσεται προσκολλημένο σε στερεά υποστρώματα, ή αιωρούμενο στη θάλασσα. Τα φύκια αυτά είναι πολυμορφικά με διάφορες μορφολογίες οι οποίες εξαρτώνται από τον βαθμό αλατότητας του νερού ή την συμβίωση με βακτήρια.

Αποτελούνται από μεγάλα ποσοστά υδατανθράκων (περίπου 60 %), μικρότερα ποσοστά σε πρωτεΐνες (10 – 47 %) και μικρά ποσοστά λιπιδίων (1 – 3%) μαζί με τέφρα (7 – 38 %). Για αυτόν τον λόγο και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η καλλιεργήσιμη γη όλο και μειώνεται, οι επιστήμονες έχουν στραφεί στους ωκεανούς ως εναλλακτική πηγή βιομάζας.

Το μεγάλο ποσοστό υδρογονανθράκων απαρτίζεται από μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών, οι οποίοι είναι ευδιάλυτοι, όπως η Λαμιναρίνη, η Μαννιτόλη στα καφέ μακροάλη, το άμυλο και οι μαννάνες στα κόκκινα άλη και Ούλβαν στα πράσινα άλη.

Πέρα από τα πλούσια βιοδραστικά συστατικά τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω, οι μεγάλες ποσότητες της Ulva μπορεί να είναι πηγή προβλημάτων. Ειδικότερα, βλάπτουν τα θαλάσσια οικοσυστήματα και τις παραλίες καθώς κατά την βιοαποικοδόμησή τους παράγουν όξινους ατμούς, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν την θανάτωση ζώων και ανθρώπων. Συγκεκριμένα, το 2009 στις ακτές της Βρετανίας στην δυτική Γαλλία, ένας θάνατος αλόγου αποδόθηκε στο γεγονός ότι το ζώο είχε εισπνεύσει τοξικούς ατμούς λόγω της βιοαποδόμησης του μακροάλγους. [2]



Εικόνα 5. Θαλάσσιο φύκος *Ulva sensu lato* [11]

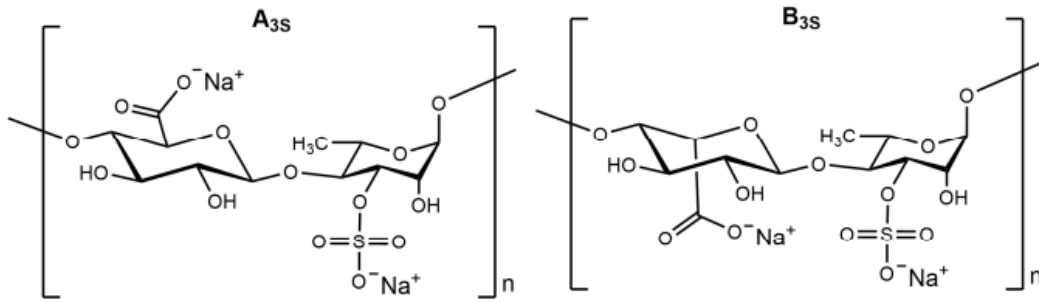
### Βιοδραστικά Συστατικά της Ulva

Οι πρωτεΐνες της Ulva παρέχουν αντιοξειδωτική δράση, δρουν ως αναστολείς ενζύμων στα αγγεία και έχουν ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις. Επιπλέον, η Ulva έχει υδρο – διαλυτή και αδιαλυτή κυτταρίνη σε ποσοστό (38 – 52 %) που αντιστοιχεί σε πολυσακχαρίτες με κύριο συστατικό του Ulvan [12].

Τα κύρια συστατικά του Ulvan είναιθειικοί πολυσακχαρίτες με ραμνόζη, ουρονικά οξέα και ξυλόζη ως κύρια συστατικά, καθώς και γλυκάνες, όπως το άμυλο [13] [14].

Ο πολυσακχαρίτης Ulvan, χρησιμοποιείται ευρέως σαν προσθετικό φαγητού και πολλές έρευνες έχουν εξετάσει τα θεραπευτικά του οφέλη. Χρησιμοποιείται στα φάρμακα και σε βιοχημικές εφαρμογές λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων του. Ειδικότερα παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές και αντι – ιικές ιδιότητες [12]. Ακόμα συνεισφέρει στην ενδυνάμωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και δίνει ευελιξία εμποδίζοντας έτσι την αποκόλληση των αλγών κατά το φαινόμενο της παλίρροιας [2] . Επιπροσθέτως, αναφέρεται ότι οι πολυσακχαρίτες της Ulva χρησιμοποιούνται στα φάρμακα, στους επιδέσμους των πληγών και σε διάφορες άλλες βιοϊατρικές εφαρμογές [15]. Επίσης, είναι πλούσια σε ω – 3 λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις, χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Επιπλέον, αποτελεί σημαντική πηγή αμινοξέων, πρωτεϊνών, σιδήρου και ακόρεστων λιπιδίων. Τέλος, η ισορροπία που υπάρχει μεταξύ Νατρίου και Καλίου, καθιστούν την Ulva διατροφικά ευεργετική. [2]

Από την άλλη μεριά, η Ulva όπως και πολλά μακροάλγη αποτελούνται από βαρέα μέταλλα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην κατανάλωση. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι υπάρχουν ποσότητες Ni, το οποίο δεν είναι και τόσο τοξικό μέταλλο, οι οποίες ταυτίζονται με το ανώτατο όριο συγκέντρωσης του [16]. Η παρουσία των μετάλλων αυτών προέρχονται από το θαλασσινό νερό και προκαλούν προβλήματα στην χρήση της Ulva ως τροφή ζώων [17].



Εικόνα 6. Πολυσακχαρίτες Ulvan [12]

## Εφαρμογές Ulva

Δύο από τις σημαντικότερες χρήσεις του μακροάλγους Ulva είναι στον τομέα των τροφίμων και στον τομέα των βιοκαυσίμων. [2]

Λόγω του ότι αποτελεί πηγή σημαντικών αμινοξέων, πρωτεϊνών, σιδήρου και ακόρεστων λιπιδίων μπορεί να καταναλωθεί στην διατροφή ως τρόφιμο ή ως συμπλήρωμα. Είναι σημαντικό όμως να μην καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες καθώς οι επιτρεπτές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, φυτοφαρμάκων και αρωματικών υδρογονανθράκων βρίσκονται υπό μελέτη. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διατροφή ψαριών και μαλάκιων με σκοπό την ενίσχυση της ανοσίας τους. [2]

Σημαντική είναι η συνεισφορά της και στην γεωργία, καθώς ενισχύει την βλαστική ανάπτυξη στα φυτά (πχ φασολιές) υπό συνθήκες ξηρασίας και περιορίζει την υπεροξείδωση λιπιδίων αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε φαινολικά. Τα υδατικά εκχυλίσματα της Ulva ενισχύουν την βλαστική ανάπτυξη υπό συνθήκες στρες ξηρασίας καθώς και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες για το φυτό *Salvia officinalis*. [2]

Η αξιοποίηση της Ulva για την παραγωγή βιοκαυσίμων έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Ειδικότερα, τα έλαια της, είναι κατάλληλα για αντιδράσεις εστεροποίησης/μετεστεροποίησης για την παραγωγή βιοντίζελ. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της είναι ότι δεν χρειάζεται επιπλέον εκτάσεις γης για καλλιέργεια και λιπάσματα. Τα πιο διαδεδομένα καύσιμα στα οποία χρησιμοποιείται είναι το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. [2]

Στο τομέα της κοσμητολογίας, τα όξινα εκχυλίσματα της Ulva είναι ικανά να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά και να προστατεύσουν τα καλλυντικά προϊόντα από την οξειδωσή τους. [2]

Τέλος υπάρχει και μια καινούρια υποσχόμενη και εναλλακτική τεχνικής παραγωγής Υδρογόνου από Ulva μέσω αναερόβιας ζύμωσης στο σκοτάδι. [2]

## Μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών

Οι μέθοδοι εκχύλισης αλγών, κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα, είναι οι πιο παραδοσιακές μέθοδοι, οι οποίες ονομάζονται συμβατικές και οι νέες μέθοδοι οι οποίες θεωρούνται «πράσινες» και εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. [18]

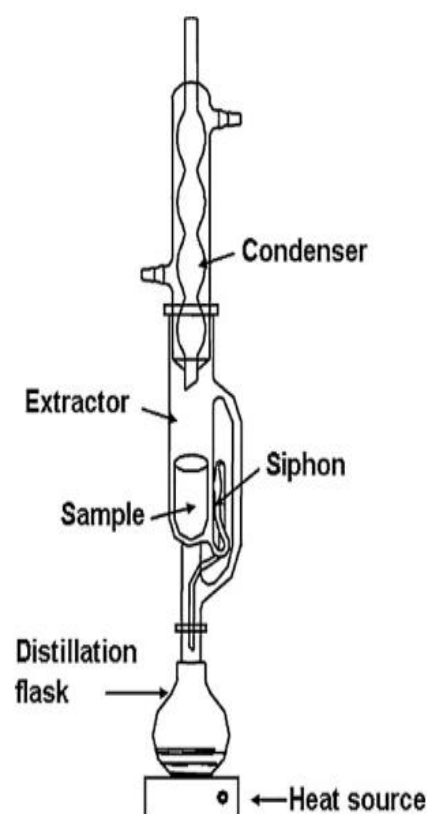
### Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Διάφορες φυσικές μέθοδοι διαχωρισμού έχουν αναπτυχθεί για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από τα φυτά. Κάποιες από τις υπάρχουσες είναι οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης, οι οποίες ονομάζονται συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η εκχύλιση Soxhlet, η Υδροαπόσταξη και η εκχύλιση στερεού – υγρού. Η επιλογή της εκάστοτε διεργασίας εξαρτάται από τις προς εκχύλιση βιοδραστικές ουσίες ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση και η υψηλότερη καθαρότητα.

[19]

Η πιο διάσημη από αυτές είναι η Soxhlet (εικόνα 7) καθώς είναι η πιο απλή, είναι ασφαλής και έχει την δυνατότητα να εξελιχθεί (“scale up”) [18]. Ωστόσο το γεγονός ότι η μεταφορά μάζας μειώνεται λόγω της ύπαρξης περισσότερων από μία φάσεων, συχνά περιορίζει την χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου [19].

Στην διπλανή εικόνα παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της εκχύλισης Soxhlet. Στο κάτω μέρος, υπάρχει μια σφαιρική φιάλη όπου εκεί τοποθετείται ο διαλύτης. Αυτός θερμαίνεται καθ’ όλη την διάρκεια του πειράματος, εξατμίζεται και οι ατμοί του συμπυκνώνονται με την βοήθεια του συμπυκνωτήρα. Έπειτα πέφτουν σταδιακά στο σημείο που βρίσκεται το στερεό δείγμα και όταν γίνει υπερχειλίση του διαλύτη, ο τελευταίος επιστρέφει στην σφαιρική φιάλη με την βοήθεια ενός σιφωνιού. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την ολοκλήρωση της εκχύλισης, δηλαδή τον αποχρωματισμό του διαλύτη που συγκεντρώνεται στο δείγμα [20].



Εικόνα 7. Πειραματική διάταξη Soxhlet

Αναφορικά με την συμβατική εκχύλιση στερεού – υγρού αυτή συνήθως πραγματοποιείται σε έναν δοχείο διπλού τοιχώματος. Υπάρχει συνεχής ανάδευση και το διπλό τοίχωμα μπορεί και να θερμαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις. Παράγοντες όπως ο χρόνος, η αναλογία πρώτης ύλης – διαλύτη και η φύση του διαλύτη επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών της υπό μελέτη ουσίας [21].

Οι παραπάνω μέθοδοι συνδυάζονται με υψηλούς χρόνους εκχύλισης οι οποίοι εξαρτώνται από τους ρυθμούς διάχυσης των διαλυτών. Επίσης είναι έντονες ενεργειακά και λόγω των υψηλών θερμοκρασιών, ενδέχεται ορισμένες θερμοευαίσθητες ουσίες να

καταστραφούν από τη θερμική καταπόνηση. Τέλος, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι τοξικοί προς το περιβάλλον, όπως για παράδειγμα το Εξάνιο το οποίο κατάτασσεται στην υψηλότερη θέση στους ατμοσφαιρικούς ρύπους από την EPA. [19]

### **Νέες «πράσινες» μέθοδοι εκχύλισης**

Οι παραπάνω περιορισμοί σε συνδυασμό με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από φυσικές πρώτες ύλες, όπως τα άλγη,, ενέτειναν την ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων εκχύλισης πιο φιλικών προς το περιβάλλον, λιγότερο χρονοβόρων και όσο το δυνατόν πιο οικονομικά και ενεργειακά συμφέρουσες [19]. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι ακόλουθες:

- Υπερκρίσιμη εκχύλιση (Supercritical Extraction)
- Εκχύλιση με την βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave Assisted Extraction)
- Εκχύλιση με την βοήθεια υπερήχων (Ultrasound – Assisted Extraction)
- Εκχύλιση με την βοήθεια ενζύμων (Enzyme – assisted extraction)
- Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction) [18]

Οι παραπάνω πράσινες μέθοδοι σε συνδυασμό με την χρήση πράσινων διαλυτών, όπως το CO<sub>2</sub> και το νερό, άλλων διαλυτών όπως αιθανόλη και ιοντικών διαλυτών αποτελούν μια λύση στην ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για το περιβάλλον και χωρίς να αφήνεται κάποιο τοξικό αποτύπωμα σε αυτό. Εκτός από την ατοξικότητα των ίδιων είναι σημαντικό να αναφερθεί και η ατοξικότητα του εκχυλίσματος που λαμβάνεται καθώς ούτε σε αυτό αφήνεται κάποιο επικίνδυνο αποτύπωμα από τους «πράσινους» διαλύτες. Έτσι λοιπόν τα παραγόμενα προϊόντα θεωρούνται «φυσικά», ακίνδυνα, ασφαλή και προτιμούνται από τους καταναλωτές. Φυσικά, έχουν κι αυτές τους δικούς τους περιορισμούς, όπως τις μεγάλες επενδύσεις κεφαλαίων λόγω του υψηλού πάγιου κόστους [22] .

Παρακάτω αναλύεται λεπτομερώς η «πράσινη» μέθοδος της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης (Υ.Ε)

### **Υπερκρίσιμη Τεχνολογία**

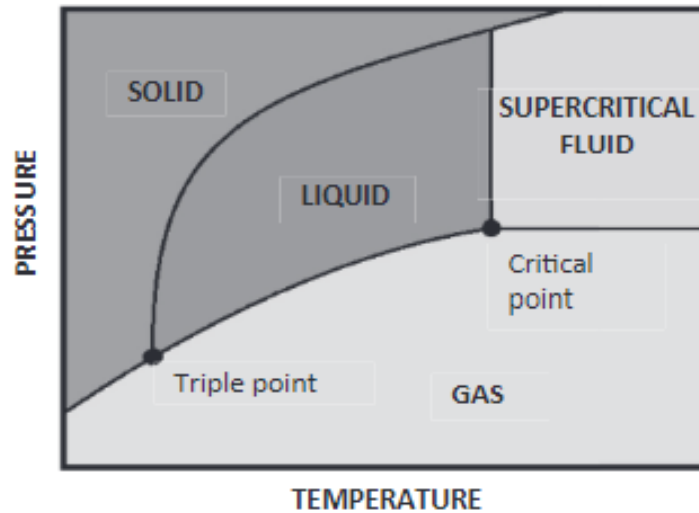
Στις μέρες μας υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη εναλλακτικών τεχνολογικών διαδικασιών με ελάχιστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Κάποιες από αυτές είναι η μειωμένη κατανάλωση ενέργειας, λιγότερα τοξικά απόβλητα, καλύτερη χρήση των παραπροϊόντων και πιο καθαρά τελικά προϊόντα. Για αυτούς τους λόγους, από το 1970 και μετά, οι βιομηχανίες έχουν στραφεί στις υπερκρίσιμη τεχνολογία. [23, 24]

### **Υπερκρίσιμα ρευστά**

Ένα ρευστό θεωρείται υπερκρίσιμο όταν η θερμοκρασία και η πίεση του είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες κρίσιμες (T<sub>c</sub>: Κρίσιμη θερμοκρασία, P<sub>c</sub>:Κρίσιμη πίεση). Στην υπερκρίσιμη κατάσταση η διάκριση μεταξύ υγρής και αέριας φάσης εξαφανίζεται και το ρευστό δεν μπορεί να γίνει υγρό αυξάνοντας την πίεση αλλά ούτε αέριο αυξάνοντας τη θερμοκρασία. Με αυτόν τον τρόπο, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ρευστού, όπως η πυκνότητα, η διαχυτότητα, η διηλεκτρική σταθερά αλλά και το ιξώδες μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν μεταβάλλοντας την πίεση ή τη θερμοκρασία, χωρίς να υπάρξει αλλαγή φάσης. [25]

Ένα τυπικό διάγραμμα φάσεων P – T μια καθαρής ουσίας φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:





Εικόνα 8. Διάγραμμα φάσεων καθαρής ουσίας [23]

Το παραπάνω διάγραμμα ονομάζεται διάγραμμα φάσεων. Παρουσιάζει τα σημεία στα οποία μια καθαρή ουσία μπορεί να υγρή, αέρια ή στερεή. Οι καμπύλες μεταξύ των φάσεων (καμπύλες κορεσμού) δείχνουν τα σημεία στα οποία συνυπάρχουν δύο φάσεις. Για παράδειγμα στην καμπύλη μεταξύ στερεής και υγρής φάσης συνυπάρχει η στερεή και η υγρή φάση. Η συγκεκριμένη καμπύλη ονομάζεται καμπύλη τήξης. Η καμπύλη μεταξύ υγρής και αέριας ονομάζεται καμπύλη ατμοποίησης και αυτή μεταξύ στερεής και αέριας ονομάζεται καμπύλη εξάχνωσης. Ακόμα φαίνεται το τριπλό σημείο, όπου εκεί συνυπάρχουν και οι τρεις φάσεις καθώς και το κρίσιμο σημείο όπου εκεί παρουσιάζονται οι οριακές συνθήκες όπου η υγρή και αέρια φάση συμπίπτουν. Όταν λοιπόν μια καθαρή ουσία βρίσκεται λίγο πάνω από τις κρίσιμες συνθήκες, τότε φτάνει σε υπερκρίσιμες συνθήκες [26]

Τα υπερκρίσιμα ρευστά (Υ.Ρ.) συμπεριφέρονται σαν υγρά και σαν αέρια ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα εμφανίζονται ιδιότητες και διαχυτότητα αντίστοιχη των αερίων και πυκνότητα και διαλυτική ικανότητα σαν των υγρών, γεγονός που τα καθιστά έναν εξαιρετικό διαλύτη για διάφορες εφαρμογές. Οι διεργασίες που αφορούν τα Υ.Ρ. είναι βιώσιμες, φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικές. Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι ότι τα ΥΡ που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως πτητικά και μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με απλή πτώση της πίεσης σαν αέρια από το τελικό προϊόν, το οποίο δεν υφίσταται έτσι καμία επιπλέον θερμική ή άλλη καταπόνηση για την απομάκρυνση του διαλύτη. Επίσης, το αέριο ανακτάται, ανακυκλώνεται και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

Τα περιβαλλοντικά οφέλη από την χρήση Υ.Ρ σε βιομηχανικές διεργασίες, όπως η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, δείχνουν την δυνατότητα τους να αντικαταστήσουν τους πολύ πιο επιβλαβείς για το περιβάλλον οργανικούς διαλύτες. Για αυτόν τον λόγο, πολλά Υ.Ρ ονομάζονται «πράσινοι διαλύτες για το μέλλον». Επίσης, τα οφέλη για την υγεία είναι ιδιαίτερα εμφανή στην χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) και υπερκρίσιμου νερού ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Είναι μη καρκινογόνοι, μη τοξικοί και μη εύφλεκτοι. Ένα άλλο πλεονέκτημα αναφέρεται στη δυνατότητα προσαρμογής των θερμοφυσικών ιδιοτήτων όπως η διαχυτότητα, το ιξώδες, η πυκνότητα και η διηλεκτρική σταθερά, μεταβάλλοντας απλά την πίεση και / ή τη θερμοκρασία. Ακόμα, η μεταφορά μάζας είναι πιο εύκολη κατά την παρουσία

ενός υπεγκρίσιμου ρευστού σε σχέση με ένα υγρό, επειδή ο συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος και το ιξώδες και η επιφανειακή τάση μικρότερες.

Όσον αφορά τη διαλυτική ικανότητα, αυτή ρυθμίζεται εύκολα από την πυκνότητα, η οποία σε αντίθεση με τα υγρά μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα με μεταβολή της πίεσης ή της θερμοκρασίας. Ειδικότερα, μια ισοθερμική αύξηση της πίεσης κοντά στο κρίσιμο σημείο, επιφέρει αξιοσημείωτη αύξηση της πυκνότητας του ρευστού, Η επίδραση αυτή γίνεται λιγότερο έντονη καθώς απομακρύνεται κανείς από το κρίσιμο σημείο. Με άλλα λόγια, η διαλυτική ισχύς του υπεγκρίσιμου ρευστού μπορεί να ελεγχθεί πιο εύκολα σε σχέση με έναν υγρό διαλύτη. [23, 25]

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες για ορισμένους υπεγκρίσιμους διαλύτες.

**Πίνακας 1. Κρίσιμες πιέσεις και θερμοκρασίες για μερικούς υπεγκρίσιμους διαλύτες [27]**

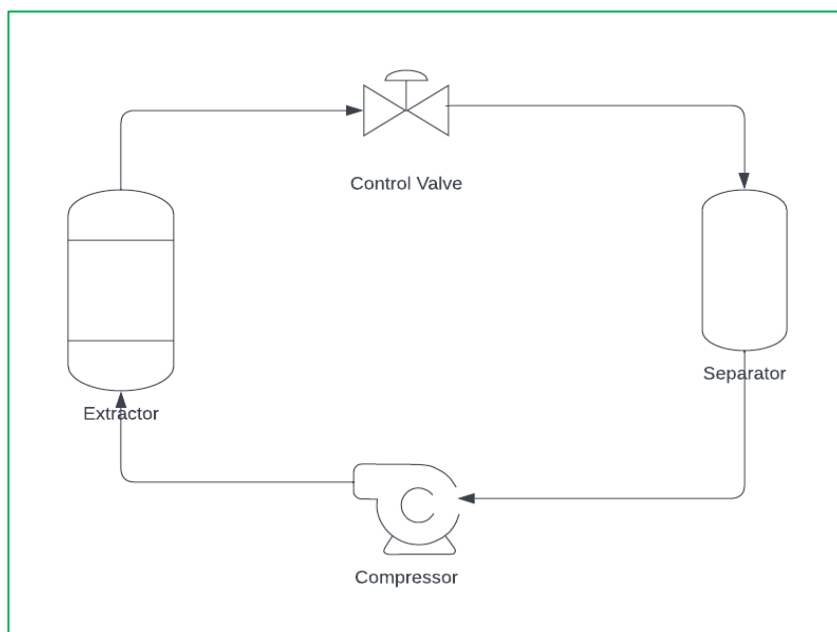
Υπεγκρίσιμα ρευστά	Ονομασία	Κρίσιμη θερμοκρασία T <sub>c</sub> (°C)	Κρίσιμη πίεση P <sub>c</sub> (bar)
Ar	Αργό	-122.5	48.6
CO <sub>2</sub>	Διοξείδιο του άνθρακα	31.1	73.8
H <sub>2</sub> O	Νερό	373	220.6
SF <sub>6</sub>	Εξαφθοριούχο Θείο	45.5	37.6
Xe	Ξένον	16.6	58.3
CHF <sub>3</sub>	Φθοροφόρμιο	25.9	48.2
CH <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	Διφθορομεθάνιο	78.1	57.8
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Αιθανόλη	126.9	54
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	Προπάνιο	96.7	42.5

### Υπεγκρίσιμη εκχύλιση

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τις υπεγκρίσιμες τεχνολογίες. Οι επιστημονικές δημοσιεύσεις αυξάνονταν ριζικά μετά το 1980 και μέχρι το 1990 γίνονταν 100 κάθε χρόνο. Οι περισσότερες από αυτές αφορούσαν τους κλάδους των τροφίμων, των φαρμάκων και των χημικών βιομηχανιών, παρόλο που οι υπεγκρίσιμες τεχνικές έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς και για άλλα θέματα όπως περιβαλλοντικά. Μια από τις πιο ευρέως γνωστές και χρησιμοποιούμενες υπεγκρίσιμες τεχνικές, είναι αυτή της υπεγκρίσιμης εκχύλισης (Υ.Ε) (SFE: Supercritical Fluid Extraction). [25]

### Αρχή λειτουργίας

Η Υ.Ε είναι μια απλή διεργασία, της οποίας το διάγραμμα ροής φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 9. Διάγραμμα ροής Υ.Ε

Αρχικά, το ρευστό διέρχεται από μια αντλία συμπίεσης ( Compressor ), ώστε να φτάσει σε υπερκρίσιμες συνθήκες. Έπειτα εισέρχεται στον εκχυλιστήρα, όπου είναι τοποθετημένη η πρώτη ύλη. Ο εκχυλιστήρας θερμαίνεται καθ'όλη την διάρκεια σε θερμοκρασία υψηλότερη από την κρίσιμη θερμοκρασία του ρευστού. Στην συνέχεια το ρευστό μαζί με ποσότητα εκχυλίσματος κατευθύνονται προς τους διαχωριστήρες. Στο ρεύμα αυτό παρατηρείται πτώση της πίεσης, δηλαδή εκτόνωση του διαλύτη, άρα και μείωση της διαλυτότητας. Από τους διαχωριστήρες παραλαμβάνεται το εκχύλισμα και ο διαλύτης ανακυκλοφορεί και η διαδικασία της εκχύλισης συνεχίζεται μέχρι να φτάσει εις πέρας. [28] [29]

Ο πιο συνηθισμένος διαλύτης για την υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ). Είναι καλός διαλύτης λόγω της ατοξικότητάς του, είναι μη εύφλεκτος, φθηνός, εύκολα διαθέσιμος και μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα από τα εκχυλίσματα. Επίσης, η κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση του είναι σχετικά χαμηλές. Οι ιδιότητές του αυτές το καθιστούν κατάλληλο για εκχύλιση θερμοευαίσθητων και μη πολικών βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, λόγω της μη πολικής φύσης του, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνος του για την διάλυση πολικών μορίων. Έτσι για την εκχύλιση των τελευταίων είναι συνηθισμένο να χρησιμοποιείται μαζί με το  $\text{CO}_2$  και ένας ακόμα πολικός διαλύτης (συν – διαλύτης). Συνήθως οι συν – διαλύτες είναι αλκοόλες όπως Αιθανόλη, Μεθανόλη κ.α. Η προσθήκη των διαλυτών αυτών μπορεί να προσδώσει αυξημένη ή μειωμένη πολικότητα, να ευνοήσει την εκχύλιση αρωματικών ενώσεων και να επηρεάσει την εκλεκτικότητα της διεργασίας. Συνήθως τα ποσοστά των συν – διαλυτών είναι 5 – 10 % της ροής του  $\text{CO}_2$ , αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να φτάσουν και το 50 % [25] [27] [30].

## Πλεονεκτηματα – Μειονεκτηματα

Η διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης μπορεί να είναι μια μέθοδος πράσινη και πολλά υποσχόμενη, αλλά εκτός από θετικά παρουσιάζει και κάποια αρνητικά στοιχεία. Παρακάτω παρουσιάζονται τα βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της:

### Πλεονεκτήματα:

- Οι διεργασίες της υπερκρίσιμης εκχύλισης πραγματοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες καθώς ορισμένοι υπερκρίσιμοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως έχουν χαμηλές κρίσιμες θερμοκρασίες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μπορούν να εκχυλιστούν θερμοευαίσθητες ή θερμικά ασταθείς βιοδραστικές ουσίες αλλά και το κόστος ενέργειας να είναι χαμηλότερο.
- Πολλά υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το CO<sub>2</sub>, είναι αέρια σε συνθήκες περιβάλλοντος με αποτέλεσμα η απομάκρυνση του διαλύτη από το εκχύλισμα να είναι πιο απλή και εύκολη. Κατά συνέπεια το εκχύλισμα που προκύπτει είναι απαλλαγμένο από διαλύτη χωρίς χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία απομάκρυνσης τους διαλύτη. Συμπερασματικά, η Υ.Ε μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία πράσινη μέθοδος, ακίνδυνη προς το περιβάλλον.
- Η διαλυτική ισχύς του διαλύτη μπορεί να ελεγχθεί εύκολα. Σε αντίθεση με τα υγρά ρευστά, που η διαλυτική ισχύς είναι σχεδόν σταθερή, στα υπερκρίσιμα ρευστά μπορεί πολύ εύκολα να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί μέσω της αλλαγής της πίεσης ή της θερμοκρασίας ή και της προσθήκης συνδιαλύτη.
- Οι περισσότεροι χρησιμοποιούμενοι υπερκρίσιμοι διαλύτες είναι ατοξικοί και φιλικό προς το περιβάλλον. [28]

### Μειονεκτήματα

- Η λειτουργία της μεθόδου σε υψηλές πιέσεις επιφέρει υψηλό κόστος λειτουργίας.
- Ορισμένοι διαλύτες είναι ευφλεκτοί όπως το αιθυλένιο (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), το αιθάνιο (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) κ.α.
- Η διεργασία μπορεί να είναι ασυνεχής ή ημισυνεχής λόγω των υψηλών πιέσεων δυσχεραίνοντας την επεξεργασία στερεών πρώτων υλών.
- Απουσία ενός θερμοδυναμικού μοντέλου για την περιγραφή της ισορροπίας φάσεων και ενός μαθηματικού μοντέλου για την περιγραφή της διεργασίας, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η διενέργεια πειραματικών μετρήσεων ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας. [28]

## Εφαρμογές Υπερκρίσιμης εκχύλισης – Υπερκρίσιμων ρευστών

Τα πρώτα χρόνια, η εφαρμογή των υπερκρίσιμων ρευστών βασιζόταν στην ανάκτηση ορισμένων φυσικών προϊόντων. Από τις αρχές του 1990 και έπειτα, το ενδιαφέρον των βιομηχανιών έχει αυξηθεί για την διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης και για αυτό τον λόγο έχουν πληθύνει και τα επιστημονικά άρθρα πάνω σε αυτό το θέμα. Ο συνηθέστερος διαλύτης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι το διοξείδιο του άνθρακα, λόγω ατοξικότητας, χαμηλού κόστους κ.τ.λ.π. [31]

Πιθανώς η πιο εκτεταμένη χρήση της Υ.Ε είναι στον τομέα των τροφίμων. Χρησιμοποιείται για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών όπως αντιοξειδωτικά, αρώματα, χρωστικές, έλαια φυτών κ.α. Ειδικότερα τα τελευταία είναι σημαντικά για τις γεύσεις και τα αρώματα και η εκχύλιση τους με άλλες μεθόδους είναι δύσκολη καθώς παρουσιάζουν θερμική ευαισθησία και αστάθεια. [32]. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών. Για παράδειγμα, το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα με συνδιαλύτη το νερό, για την απομάκρυνση της καφεΐνης από το πράσινο τσάι και τον καφέ, στην εκχύλιση του λυκίσκου, και τη διύλιση λιπαρών οξέων. [31] [33] [34]

Πολλές εφαρμογές υπάρχουν και στον τομέα των φαρμάκων, όπου πραγματοποιείται λήψη εκχυλισμάτων φυτών ώστε να εξαχθούν διτερπένια (αντιοξειδωτικά), τριτερπένια (φυτοστερόλες) ή ακόμη και τετρατερπένια (καροτένια) [35]. Επίσης, η Υ.Ε βρίσκει εφαρμογές και στον τομέα της κοσμετολογίας και των καλλυντικών, καθώς και σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιείται εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών [36].

Επιπλέον, η Υ.Ε χρησιμοποιείται και για περιβαλλοντικά θέματα, όπως για την εκχύλιση υδρογονανθράκων από πετρέλαιο, διεργασία που έχει υιοθετηθεί από τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA). [31]

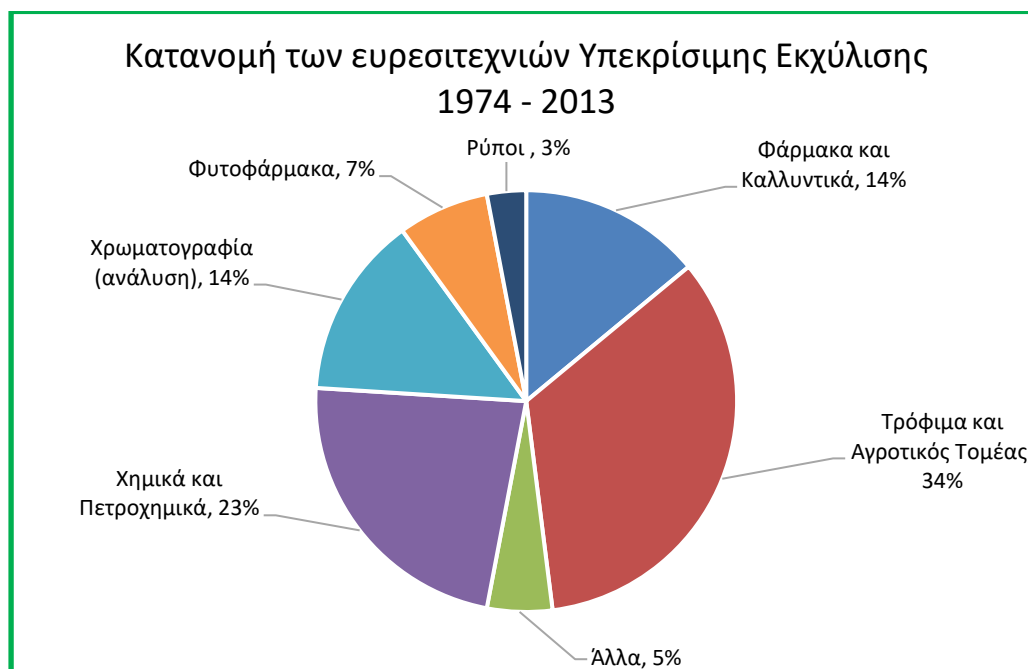
Τα υπερκρίσιμα ρευστά συναντιούνται και στον τομέα των πολυμερών καθώς μπορούν να λάβουν μέρος στην σύνθεση, στον καθαρισμό και στην επεξεργασία των πολυμερών [37]. Ακόμα χρησιμοποιούνται και στην βιομηχανία των πλαστικών για την ρύθμιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πολυμερών μέσω της διαχύσης του υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> σε αυτά, στην κατάλυση διαφόρων οργανικών ενώσεων στη χημική βιομηχανία, στη βιομηχανία των υλικών, στην βιομηχανία της ξυλείας κ.α. [35]. Τέλος βρίσκουν εφαρμογή και στην ναοϊατρική καθώς επιτρέπουν την ελεγχόμενη παραγωγή βιολογικά ενεργών ναοσωματιδίων, ναοδομημένων σωματιδίων και ναοπορώδων υλικών [38].

Τα υπερκρίσιμα ρευστά χρησιμοποιούνται και στην χρωματογραφία. Επιτυγχάνουν τον διαχωρισμό των οργανικών ενώσεων όταν χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση. Ειδικότερα, το χαμηλό ιξώδες και η υψηλή διαχυτότητά τους, προσφέρουν γρηγορότερους διαχωρισμούς και αναλύσεις των συστατικών ενός διαλύματος σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η χρήση των Υ.Ρ στην HPLC μπορεί να είναι μια καλή εναλλακτική έναντι των τοξικών οργανικών και πτητικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται σε αυτήν. Ένα άλλο θετικό, είναι ότι τα υπολείμματα των Υ.Ρ μπορεί να είναι λίγα ή και καθόλου [39].

Όπως και στις υπερκρίσιμες εκχυλίσεις έτσι και σε αυτήν την περίπτωση, ο πιο συνηθισμένος διαλύτης είναι το CO<sub>2</sub>. Οι χαμηλές κρίσιμες θερμοκρασίες του, επιφέρουν τον ευκολότερο διαχωρισμό των θερμοευαίσθητων ενώσεων. Στην περίπτωση των πολικών ενώσεων, όπως

και στην Υ.Ε, έτσι κι εδώ γίνεται χρήση πολικών συν – διαλυτών. Πολλές ενώσεις έχουν διαχωριστεί και/ή αναλυθεί με αυτόν τον τρόπο όπως ολιγομερή, χοληστερόλες, πολυμερή, εκδυστεροειδή κ.α. [39].

Παρακάτω ακολουθεί ένα διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει την κατανομή των ευρεσιτεχνιών για την υπερκρίσιμη εκχύλιση.



Διάγραμμα 1. Κατανομή ευρεσιτεχνιών για υπερκρίσιμη εκχύλιση 1974 – 2013 [40]

## Ανάλυση εκχυλισμάτων

### Αντιοξειδωτική δράση

#### Θεωρητικό υπόβαθρο

Το οξυγόνο είναι το απαραίτητο στοιχείο για την ζωή. Η οξειδωτική του ιδιότητα παίζει ζωτικό ρόλο σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα και είναι απαραίτητη για την ζωή. Ωστόσο μπορούν να προκληθούν και βλάβες στα κύτταρα μέσω αυτής. Ειδικότερα, όταν το οξυγόνο χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή του ATP (Τριφωσφορική αδενοσίνη) δημιουργούνται δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) σαν παραπροϊόντα. Παράγονται ενδωγενώς αλλά και εξωγενώς μέσω της υπερϊώδους ακτινοβολίας, της ρύπανσης, του τσιγάρου κ.α.

Σαν ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα μόρια που αποτελούνται από ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Τα συγκεκριμένα ηλεκτρόνια είναι πολύ ασταθή και δίνουν σημαντικούς βαθμούς αντιδραστικότητας στην ελεύθερη ρίζα. Κάποιες από αυτές είναι οι ρίζες του υδροξυλίου (OH·), του ανιόντος υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·), του νιτρικού οξειδίου (NO·), του αλκοξυλίου (RO·) κ.α.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού έναντι μολυσματικών παραγόντων από φαγοκυτταρικά κύτταρα, του καρκίνου που προέρχεται από μακροφάγα και κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα καθώς και στην αποτοξίνωση ξеноβιοτικών.

Επιπροσθέτως, παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση ενεργοποιώντας διάφορες πρωτεΐνες. Ωστόσο, όταν οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και γίνεται υπερ - παραγωγή τους, δημιουργείται οξειδωτικό στρες, το οποίο έχει ως συνέπεια την καταστροφή κυτταρικών δομών, όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών και του DNA. Με άλλα λόγια, επικρατεί μια ανισορροπία στην οξειδωτική / αντιοξειδωτική δράση του οργανισμού.[41]

Για αυτόν τον λόγο υπάρχουν τα αντιοξειδωτικά, τα οποία αντιδρούν με τις δραστικές ελεύθερες ρίζες και επαναφέρουν την ισορροπία στο σύστημα. Μπορεί να είναι ενδογενή και διακρίνονται σε ενζυματικά και μη ενζυματικά και μπορεί να προέρχονται από εξωγενείς παράγοντες μέσω της διατροφής. Τα κυριότερα διατροφικά αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες C και E, τα A – καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, τα μέταλλα του Σεληνίου, Χαλκού, Μαγγανίου και Ψευδαργύρου και ορισμένες φαινόλες.[42]

### Συντελεστής αντιοξειδωτική δράσης IC50

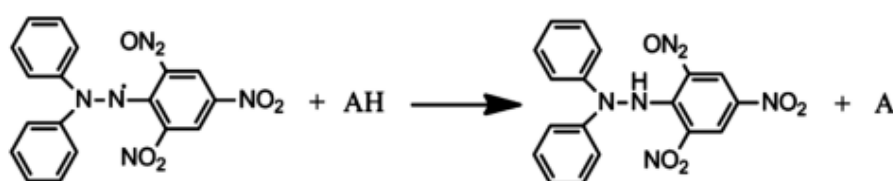
Ο συντελεστής αντιοξειδωτική δράσης IC<sub>50</sub> είναι ένα μέτρο το οποίο δείχνει την ισχύ που έχει μια ουσία να αναστείλει μια συγκεκριμένη βιοχημική ή βιολογική λειτουργία. Αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση μιας ουσίας, που χρειάζεται για να αναστείλει το 50 % μιας δραστικής ουσίας. Η τελευταία μπορεί να είναι κάποιο ένζυμο, ένα κύτταρο ή κάποια δραστική ρίζα [43] [44] .

### Μέθοδος DPPH

Μια από τις πιο διαδεδομένες και απλές μεθόδους προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών είναι αυτή που πραγματοποιείται με το αντιδραστήριο του DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Βασίζεται στην μείωση της ιώδους ελεύθερης ρίζας του DPPH, από το αντιοξειδωτικό μέσο, με την βοήθεια ενός ατόμου υδρογόνου (Εικόνα 10). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός μεταφοράς, προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος DPPH, από ιώδες σε υποκίτρινο. Η υπολοιπόμενη ρίζα του DPPH φασματοφωτομετράται σε φασματοφωτόμετρο UV - Vis σε μήκος κύματος 515 – 520 nm.

Αυτή η μέθοδος είναι πολύ απλή καθώς χρειάζεται μόνο η παρασκευή του αντιδραστήριου του DPPH και ταυτόχρονα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για το πόσο ικανή αντιοξειδωτική δράση έχει το εξεταζόμενο δείγμα. Ακόμα η ανάλυση απαιτεί ήπιες πειραματικές συνθήκες έναντι άλλων πιο παραδοσιακών αντιοξειδωτικών προτοκόλλων, που απαιτούν πιο πρόσθετες διαδικασίες τόσο για το δείγμα όσο και για το αντιδραστήριο, όπως υψηλές θερμοκρασίες ή παροχή οξυγόνου. [45]

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η αντίδραση που λαμβάνει χώρα:

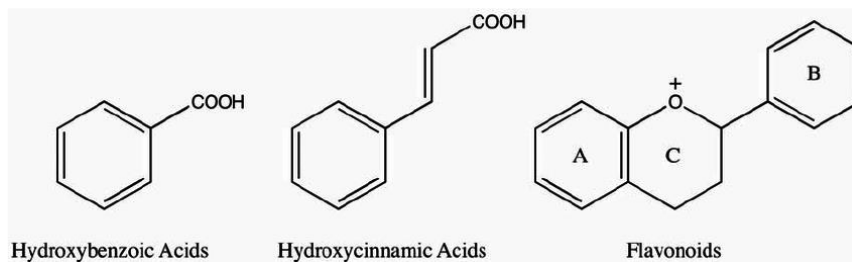


Εικόνα 10. Αντίδραση αντιοξειδωτικών με την ρίζα του DPPH [45]

## Φαινολικά Θεωρία

### Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται ως μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα μόρια τους αποτελούνται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Από χημικής άποψης, οι φαινόλες μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες όπως φαινολικά οξέα, флаβονοειδή, ισοφλαβονοειδή κ.α. Απαντώνται κυρίως σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά καθώς και σε ροφήματα όπως το τσάι, το κρασί και ο καφές. [46]



Εικόνα 11. Βασική δομή φαινολικών οξέων και флаβονοειδών [47]

### Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Οι περισσότερες μέθοδοι προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε προϊόντα διατροφής ή βιολογικά δείγματα βασίζονται στην αντίδραση φαινολικών ενώσεων με ένα χρωματομετρικό αντιδραστήριο. Μία τέτοια μέθοδος που χρησιμοποιείται πολύ συχνά και είναι από τις πιο αξιόπιστες είναι η ανάλυση Folin-Ciocalteu (F-C). Βασίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων, σε αλκαλικό μέσο, από φαινολικές ενώσεις σε σύμπλοκα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος. Τα προϊόντα της αντίδρασης παίρνουν μπλε χρώμα και η ανάλυση του δείγματος πραγματοποιείται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 760 – 765 nm. Η συγκέντρωση των φαινολικών εκφράζεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος. [48]

### Χλωροφύλλη

Η χλωροφύλλη είναι μία από τις σημαντικότερες βιοδραστικές ενώσεις που μπορούν να ανακτηθούν από τα άγλη. Υπάρχει σε αφθονία στη φύση, λόγω του κρίσιμου ρόλου που παίζει στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης και για αυτό τον λόγο είναι ζωτικής σημασίας τόσο για τα φυτά όσο και για τα ζώα. Ειδικότερα, απορροφά επιλεκτικά φως στις κόκκινες και μπλε περιοχές με αποτέλεσμα να είναι πράσινη. Αυτή η ηλιακή ενέργεια που απορροφάται, χρησιμοποιείται κατά την φωτοσύνθεση μαζί με νερό και διοξείδιο του άνθρακα για την παραγωγή οξυγόνου και υδατανθρακών. Η χλωροφύλλη αποσυντίθεται και αναπαράγεται συνεχώς σε σημαντικές ποσότητες και υπολογίζεται ότι 1,2 δισεκατομμύρια τόνοι παράγονται ετησίως στον πλανήτη. Υπάρχουν δύο βασικά είδη χλωροφύλλης, η χλωροφύλλη α και η β. Ωστόσο η χρήση των μορίων της για την εξουδετέρωση οξέων, οξυγόνου ή φωτός επιταχύνει την οξείδωση της με αποτέλεσμα να υπάρχουν και άλλα υποπροϊόντα.



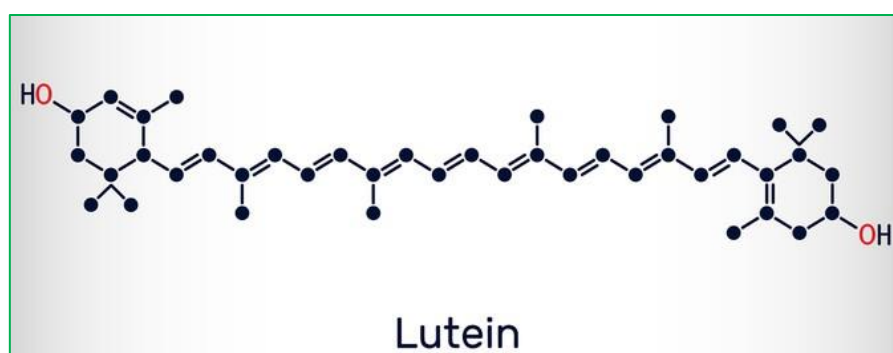
Όσον αφορά την χρήση της, είναι καλή φυσική χρωστική ουσία λόγω της επιλεκτικής απορρόφησης φωτός ορισμένων μηκών κύματος. Έχει ευρεία εφαρμογή στον χώρο των τροφίμων αλλά και στα φαρμακευτικά προϊόντα, διότι έχει αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιόνες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι επιταχύνει την ίαση των πληγών περισσότερο από 25 % και εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων. Τέλος, είναι ασταθής υπό διαφορετικές συνθήκες pH και είναι πιο ακριβή από τις τεχνητές χρωστικές. [49]

## Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι λιπιδικές χρωστικές ουσίες, οι οποίες είναι διατροφικά απαραίτητες και παρουσιάζουν πολλά οφέλη για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Συντίθενται στα πλαστίδια των φυτών και σε ορισμένους άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όπως στα φύκια, στα βακτήρια και στους μύκητες. Οι άνθρωποι και τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν καροτενοειδή, χρησιμοποιούν τις τροφές σαν πηγή αυτών.

Στο κομμάτι της δομής τους, σχηματίζονται από τα καροτένια και τις ξανθοφύλλες. Τα καροτένια είναι αλυσίδες 40 ατόμων άνθρακα με διπλούς συζευγμένους δεσμούς, ενώ οι ξανθοφύλλες είναι πιο πολικές ενώσεις, διότι περιέχουν οξυγόνο. Λόγω της δομής τους λοιπόν, είναι αποτελεσματικοί δεσμευτές ελευθέρων ριζών, γεγονός που επιφέρει την καλή αντιοξειδωτική τους ικανότητα. [50, 51]

Στις μέρες μας, η παραγωγή καροτενοειδών είναι μια από τις πιο επιτυχημένες δραστηριότητες στον τομέα της βιοτεχνολογίας των αλγών. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ζήτηση της αγοράς σε φυσικά προϊόντα έναντι των συνθετικών, όσο και αν τα τελευταία έχουν χαμηλότερο κόστος παραγωγής. Βρίσκουν εφαρμογή στον τομέα των τροφίμων σαν φυσικές χρωστικές οι οποίες υπερταίρουν των συνθετικών. Ακόμα, χρησιμοποιούνται στα φάρμακα, επειδή κάποια μεταβολίζονται σε βιταμίνη A και βοηθάνε στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κυριότερα καροτένια που συναντιούνται στα άλγη είναι η Ασταξανθίνη, η Φουκοξανθίνη, το Β – Καροτένιο, η Λουτεΐνη και η Ζεαξανθίνη. [52]



Εικόνα 12. Λουτεΐνη [53]

## Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Design Expert v13 trial version (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) και ήταν πλήρης παραγοντικός. Στα παραγοντικά πειράματα, επιλέγονται δύο ή περισσότεροι παράγοντες (π.χ. πίεση, θερμοκρασία) και αναλύεται το πως επιδρούν μόνοι τους αλλά και πως επιδρά ο συνδυασμός των επιπέδων τους (αλληλεπίδραση) σε μία μεταβλητή (π.χ. απόδοση,  $IC_{50}$ ).

Τα παραγοντικά πειράματα μπορεί να είναι πλήρη, όπου εξετάζονται όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί, μη πλήρη, κλασματικά και υπάρχει και η μεθοδολογία της αποκριτικής επιφάνειας. Τα πλεονεκτήματά τους είναι η αποτελεσματικότητά τους, η εφαρμογή των αλληλεπιδράσεων και η εκτίμησή τους αλλά και η μεγάλη ακρίβεια που παρέχουν λόγω της κρυμμένης επανάληψης. Ωστόσο παρουσιάζουν και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως ότι μπορεί κάποιος συνδυασμός να μην παρέχουν μεγάλο ενδιαφέρον και να οδηγήσουν σε κακή ερμηνεία αποτελεσμάτων.

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε ένας παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων με 3 παράγοντες ( $2^3$  παραγοντικός σχεδιασμός). Οι παράγοντες είναι η πίεση, η θερμοκρασία και ροή του  $CO_2$ . Τα επίπεδα είναι δύο, ένα υψηλό και ένα χαμηλό (μέγιστη και ελάχιστη τιμή για κάθε παράγοντα). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και επαναλαμβανόμενος πειραματικός σχεδιασμός 4 πειραμάτων (κεντρικό σημείο) ώστε να υπάρξει συντελεστής σφάλματος. Η σχέση που περιγράφει την απόκριση του συστήματος είναι [54] :

$$Y = \mu + \alpha i + \beta j + \gamma k + (\alpha\beta)ij + (\alpha\gamma)ik + (\beta\gamma)jk + (\alpha\beta\gamma)ijk + \epsilon_{ijk} \quad (1)$$

$\mu$ : επίδραση του γενικού μέσου

$\alpha i$ : επίδραση  $i$  επιπέδου

$\beta j$ : επίδραση  $j$  επιπέδου

$\gamma k$ : επίδραση  $k$  επιπέδου

$(\alpha\beta)ij$ : αλληλεπίδραση  $\alpha i$  και  $\beta j$

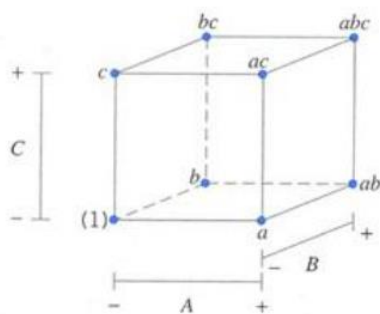
$(\alpha\gamma)ik$ : αλληλεπίδραση  $\alpha i$  και  $\gamma k$

$(\beta\gamma)jk$ : αλληλεπίδραση  $\beta j$  και  $\gamma k$

$(\alpha\beta\gamma)ijk$ : αλληλεπίδραση  $\alpha i$  και  $\beta j$  και  $\gamma k$

$\epsilon_{ijk}$ : συνιστώσα τυχαίου σφάλματος

Για  $2^3$  παραγοντικό σχεδιασμό λαμβάνουν χώρα 8 πειράματα που σχηματίζουν γωνίες κύβου:



Εικόνα 13. Κύβος για  $2^3$  παραγοντικό σχεδιασμό

Επίσης σχηματίζεται και ο παρακάτω πίνακας δοκιμών (test matrix) [55]:

*Πίνακας 2. Πίνακας δοκιμών*

A	B	C
-	-	-
+	-	-
-	+	-
+	+	-
-	-	+
+	-	+
-	+	+
+	+	+

## Πειραματικό Μέρος

### Πρώτη ύλη

Η πρώτη ύλη των πειραμάτων, είναι η ξηρή βιομάζα του μακροφύκου *Ulva lactuca*, η οποία είναι σε νιφάδες (flakes) και προμηθεύτηκε από την εταιρεία MEDITERRANEAN ALGAE TECHNOLOGIES, από την Ισπανία.

### Άλεση και Κοκκομετρική ανάλυση

Πριν την εκχύλιση της βιομάζας κρίθηκε απαραίτητη η άλεση της προκειμένου να σπάσει μέρος των κυτταρικών τοιχωμάτων και να διευκολυνθούν τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας.

Για τη διαδικασία της άλεσης χρησιμοποιείται ένα μπλέντερ (Εικόνας 14) και κάθε άλεση διαρκεί 10 δευτερόλεπτα.

Έπειτα η αλεσμένη ποσότητα τοποθετείται σε κόσκινο και ακολουθεί η κοκκομετρική ανάλυση. Αυτή, πραγματοποιείται με την χρήση πρότυπων κοσκίνων της εταιρείας Endecotts Ltd και της συσκευής Octagon digital Endecotts (Εικόνα). Η συγκεκριμένη ηλεκτρική συσκευή ανακινεί το κόσκινο ώστε να επιτευχθεί η αποτελεσματική κοσκίνιση της πρώτης ύλης. Κάθε ανακίνηση διαρκεί 5 λεπτά και το κόσκινο που χρησιμοποιείται έχει διάμετρο σπών 425 μm. Όση ποσότητα συγκρατείται, επαναλάθεται και ανακινείται ξανά.

Συνεπώς λαμβάνεται ποσότητα μακροφύκου *Ulva* με διάμετρο κόκκων μικρότερη από 425μm.



Εικόνα 14. Αριστερά συσκευή άλεσης και δεξιά η συσκευή κοσκίνισης

### Αποθήκευση

Η πρώτη ύλη μετά την προκατεργασία της αποθηκεύεται σε γυάλινα βαζάκια σε σκοτεινό μέρος.

## Συσκευή Υ.Ε

Τα πειράματα έλαβαν χώρα στην συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE 500 της εταιρείας SEPAREX CHIMIE FINE (Γαλλία), η οποία βρίσκεται στο Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, της οποίας το διάγραμμα ροής παρουσιάζεται στο



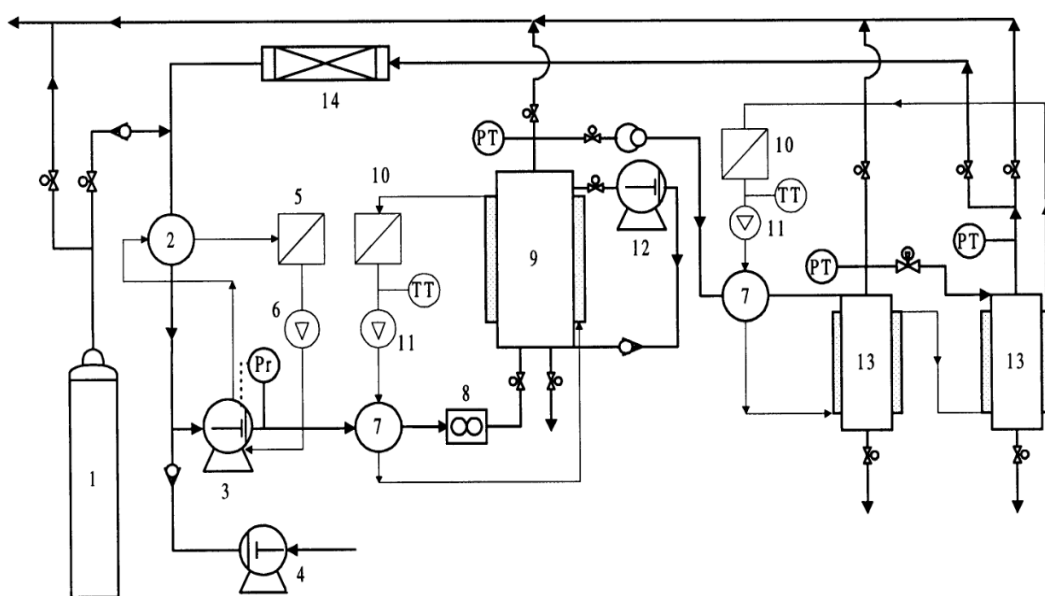
Εικόνα 15. Εργαστηριακή συσκευή Υ.Ε

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η συσκευή διαθέτει βάνες οι οποίες έχουν διαφορετικά χρώματα, ανάλογα με τον ρόλο τους. Συγκεκριμένα, το κόκκινο χρώμα δηλώνει την αποβολή CO<sub>2</sub> από τον χώρο της συσκευής προς την ατμόσφαιρα. Το μπλε χρώμα επιτρέπει και αποτρέπει την ροή του CO<sub>2</sub> στα εκάστοτε σημεία που βρίσκεται η βάνα. Το κίτρινο χρώμα το οποίο βρίσκεται στο σημείο των διαχωριστήρων και του εκχυλιστήρα επιτρέπει και αποτρέπει την έξοδο του εκχυλίσματος από τη συσκευή. Τέλος, υπάρχει και βάνα με πράσινο χρώμα, στα δεξιά της συσκευής η οποία αποβάλλει το διοξείδιο του άνθρακα από όλη την συσκευή.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά μεγέθη της συσκευής ενώ το διάγραμμα ροής της απεικονίζεται στην Εικόνα 16.

**Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά μεγέθη συσκευής Υ.Ε**

<b>Μέγιστη πίεση λειτουργίας</b>	300 bar
<b>Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας</b>	70°C
<b>Ροή διαλύτη</b>	0.6 – 2.5 kg/h
<b>Όγκος δοχείου εκχύλισης</b>	400 mL
<b>Όγκος κάθε δοχείου διαχωρισμού</b>	18 mL
<b>Θερμοκρασιακό εύρος ψυκτικού</b>	-25°C – 40°C
<b>Υλικά</b>	Ανοξειδωτος χάλυβας PTFE



**Εικόνα 16. Διάγραμμα ροής Υ.Ε [56]**

**Πίνακας 4. Πίνακας διαγράμματος ροής [56]**

1	Φιάλη CO <sub>2</sub>	8	Ροόμετρο
2	Συμπυκνωτήρας	9	Εκχυλιστήρας
3	Αντλία πίεσης CO <sub>2</sub>	10	Θερμαντικά
4	Αντλία Συν - διαλύτη	11	Αντλία θερμαντικού ρευστού
5	Δοχείο ψυκτικού	12	Αντλία ανακυκλοφορίας
6	Αντλία ψυκτικού	13	Διαχωριστήρες
7	Θερμαντήρας	14	Φίλτρο

Το διοξείδιο του άνθρακα (καθαρότητας 99.7% κ.β.) βρίσκεται αποθηκευμένο στην φιάλη σε υγρή μορφή και προμηθεύτηκε από την εταιρεία TAE Hellas.

Αρχικά, περνάει από έναν κατά αντιρροή εναλλάκτη ώστε να ψυχθεί και ύστερα από μια αντλία μεμβράνης υψηλής πίεσης (DOSAPRO Milton Roy) όπου συμβαίνει η συμπίεση του. Ύστερα οδηγείται σε έναν εναλλάκτη όπου θερμαίνεται και φτάνει σε υπερκρίσιμες συνθήκες. Έπειτα διέρχεται από το ροόμετρο και εισέρχεται στον εκχυλιστήρα (όγκου 500ml) με πορεία από κάτω προς τα πάνω.

Στην συνέχεια, CO<sub>2</sub> και εκχύλισμα εκτονώνονται στους διαχωριστήρες ενώ ταυτόχρονα θερμαίνονται ώστε να μην υπάρξει δημιουργία πάγου στον σωλήνα εκτόνωσης λόγω σημαντικής πτώσης της θερμοκρασίας. Η πίεση του πρώτου διαχωριστήρα ρυθμίζεται μέσω ενός βελονοειδούς ρυθμιστή ενώ η πίεση του δεύτερου ρυθμίζεται μέσω μιας βαλβίδας εξόδου. Τέλος είναι δυνατή και η ανακύκλωση του CO<sub>2</sub>, κατά την οποία το διοξείδιο του άνθρακα περνάει από ένα φίλτρο ενεργού άνθρακα ώστε να συγκρατηθούν τυχόν ουσίες του εκχυλίσματος.



**Εικόνα 17. Πειραματική διάταξη για χρήση συν - διαλύτη**

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται και συν - διαλύτης, χρησιμοποιείται η «διάταξη» της εικόνας 17. Ειδικότερα, υπάρχει μια ακόμη αντλία για την ροή του συν - διαλύτη, το οποίο αντλεί τον διαλύτη από την κωνική φιάλη που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι πριν την χρήση του διαλύτη, αυτός πρέπει να περάσει από την διαδικασία του “Degas”, η οποία πραγματοποιείται με χρήση υπερήχων σε συσκευή Ultra - sound. Κατά τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται όλα τα αέρια τα οποία είναι διαλυμένα μέσα στον διαλύτη. Στην συνέχεια είναι απαραίτητο να γίνει απομάκρυνση του αέρα και των φυσαλίδων από τα σημεία που περνάει ο συν - διαλύτης, καθώς δεν πρέπει να εισέλθει αέρα μέσα στην αντλία του συν - διαλύτη, προς

αποφυγή του φαινομένου της σπηλαίωσης. Αφού πραγματοποιηθούν οι δύο παραπάνω διαδικασίες, φροντίζεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα να τροφοδοτείται η κωνική φιάλη με διαλύτη, ώστε να μην εισέλθει αέρας στο σύστημα.

## Διαδικασία πειράματος

### Εκκίνηση πειράματος:

Αρχικά, πριν την έναρξη του πειράματος, ρυθμίζεται η θερμοκρασία του ψυκτικού και η θερμοκρασία λειτουργίας του πειράματος, μέσω των λουτρών θέρμανσης.

Ύστερα συναρμολογείται το δοχείο εκχύλισης μέσα στον οποίο τοποθετούνται 60 g Ulva. Ο όγκος του ανέρχεται στα 400 mL και περιέχει δύο πορώδεις μεταλλικούς δίσκους στο κάτω και στο πάνω μέρους του, οι οποίοι λειτουργούν σαν φίλτρα και βοηθούν στην καλύτερη κατανομή του διαλύτη στο εσωτερικό του κυλίνδρου. Αφού τοποθετηθεί ο κάτω δίσκος, τοποθετείται μια μικρή στρώση πληρωτικού υλικού το οποίο είναι σε μορφή μικρών γυάλινων σφαιρικών σωματιδίων. Η ύπαρξη πληρωτικού υλικού επιτρέπει την πιο ομαλή και ομοιόμορφη κατανομή του διαλύτη μέσα στον κύλινδρο και μειώνει τον κενό όγκο. Έπειτα συμπληρώνεται η επιθυμητή ποσότητα της πρώτης ύλης, επιπλέον πληρωτικό υλικό μέχρι την κορυφή και στο τέλος το πάνω φίλτρο.

Στην συνέχεια ο κύλινδρος τοποθετείται μέσα τον εκχυλιστήρα και κλείνεται με ένα έμβολο, το οποίο φέρει και έναν μεταλλικό δακτύλιο ώστε να παρέχεται αεροστεγής κάλυψη.

Αφού το ψυκτικό και τα λουτρά θέρμανσης λάβουν την επιθυμητή τιμή, το επόμενο βήμα είναι η επιλογή της πίεσης λειτουργίας η οποία καθορίζεται από την χειροκίνητη ρύθμιση της μπλε βάνας αντεπιστροφής. Αφού ελεγχθεί ότι όλες οι υπόλοιπες βάνες είναι κλειστές, ακολουθεί μια σειρά ενεργειών η οποία πρέπει να γίνει με την ακόλουθη σειρά:

1. Ανοίγεται η φιάλη του CO<sub>2</sub>.
2. Ανοίγεται η βάνα MV10 ώστε να μεταφερθεί το CO<sub>2</sub> στην αντλία.
3. Ανοίγεται η βάνα MV211 και ταυτόχρονα τίθεται σε λειτουργία η αντλία διοξειδίου του άνθρακα.
4. Ανοίγεται το ροόμετρο και ρυθμίζεται η επιθυμητή ροή διοξειδίου του άνθρακα, μέσω της αντλίας.



### **Κλείσιμο συσκευής:**

Το κλείσιμο της συσκευής πραγματοποιείται με την παρακάτω σειρά ενεργειών:

1. Κλείνεται η βάννα MV211 και ταυτόχρονα απενεργοποιείται η λειτουργία της αντλίας.
2. Κλείνεται η βάννα MV10, ώστε να σταματήσει η μεταφορά του διοξειδίου προς την αντλία και έπειτα απενεργοποιείται το ροόμετρο.
3. Κλείνεται η φιάλη του CO<sub>2</sub>.
4. Πραγματοποιείται σταδιακό κλείσιμο της μπλε βάννας αντεπιστροφής σε συνδυασμό με σταδιακή εκτόνωση μέσω των βανών διαχωριστήρων.
5. Πραγματοποιείται ολική απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα από την συσκευή.

### **Καθαρισμός συσκευής:**

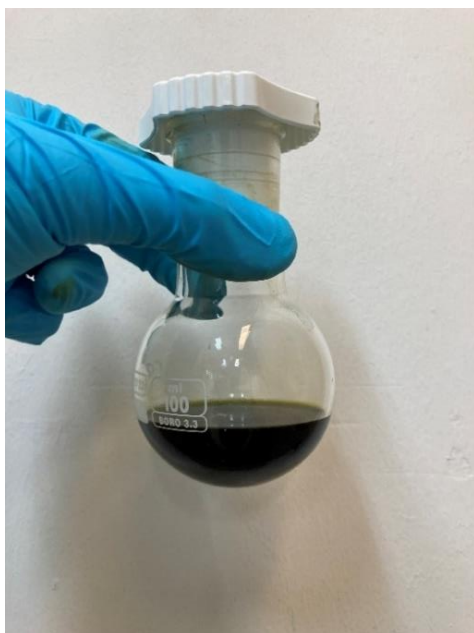
Μετά το πέρας κάθε πειράματος είναι απαραίτητο να γίνει ο καθαρισμός της συσκευής, κατά τον οποίο γίνεται και η παραλαβή του εκχυλίσματος.

Αρχικά απομακρύνεται η ποσότητα του άλγους που έχει μείνει στον κύλινδρο με την βοήθεια ενός κοσκίνου και το πληρωτικό υλικό που συγκρατείται πλένεται με σαπούνι και ακετόνη. Έπειτα, καθαρίζεται ο κύλινδρος εκχύλισης με νερό, σαπούνι και ακετόνη και τοποθετείται στον φουρνό να στεγνώσει. Ταυτόχρονα, τα φίλτρα του κυλίνδρου, καθαρίζονται με την βοήθεια Αιθανόλης καθαρισμού 99.8 %. Συγκεκριμένα τοποθετούνται στην συσκευή του Ultrasound, μέσα σε ποτήρια ζέσεως μαζί με ποσότητα αιθανόλης. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να σταματήσει ο χρωματισμός της αιθανόλης

Στο κομμάτι των διαχωριστήρων, τοποθετείται κι εκεί αιθανόλη και αφήνεται για 15 λεπτά, και στη συνέχεια συλλέγεται το περιεχόμενο τους σε σφαιρική φιάλη.

Αφού πραγματοποιηθούν τα παραπάνω, επόμενο βήμα είναι ο καθαρισμός ολόκληρης της συσκευής και η παραλαβή του εκχυλίσματος. Το δοχείο εκχύλισης συμπληρώνεται μόνο με πληρωτικό υλικό και μετά τοποθετείται ποσότητα αιθανόλης γύρω στα 50 mL. Οι συνθήκες λειτουργίας ρυθμίζονται στα 100-110 bar, 50 °C και η ροή στα 1-1.5 kg/h. Η παραλαβή εκχυλίσματος και αιθανόλης γίνεται μέσω των διαχωριστήρων με την βοήθεια ενός δοκιμαστικού σωλήνα και μιας σφαιρικής φιάλης (εικόνα 18). Η διαδικασία λαμβάνει τέλος μόλις σταματήσει η παραλαβή αιθανόλης.

Οι καθαρισμοί συνεχίζονται μέχρι την παραλαβή αποχρωματισμένων μιγμάτων από τους διαχωριστήρες.



*Εικόνα 18. Παραλαβή εκχύλισματος με αιθανόλη από τον καθαρισμό*

### **Εξάτμιση**

Λόγω του ότι το εκχύλισμα παραλαμβάνεται κατά τον καθαρισμό, θα πρέπει να απομακρυνθεί η αιθανόλη από αυτό. Για τον διαχωρισμό αυτό, οδηγείται σε έναν περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό BUCHI, Rotavapor R200. (Εικόνα 19). Η θερμοκρασία αυτού είναι στους 40 °C και η πίεση ρυθμίζεται στα 175 mbar και μειώνεται σταδιακά, έως τελικής εξάτμισης της αιθανόλης.

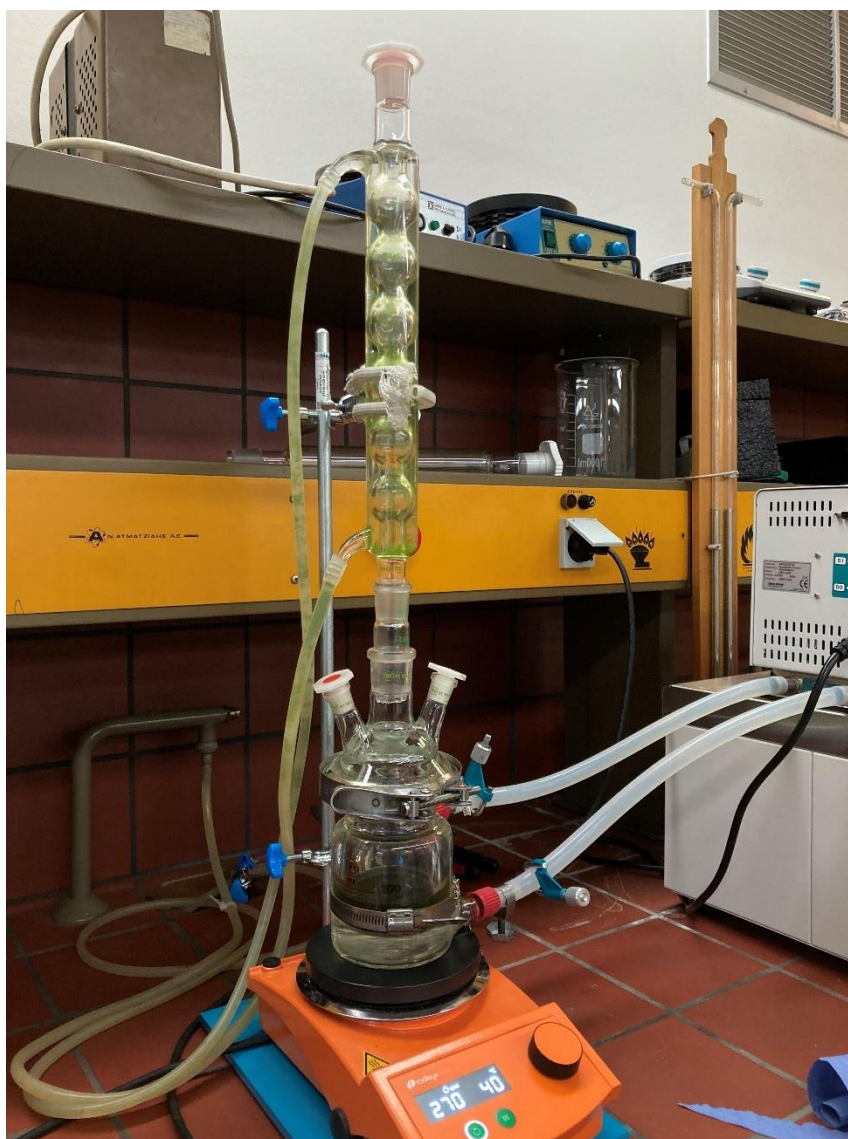


*Εικόνα 19. Εξατμιστήρας για την απομάκρυνση αιθανόλης*

## Συμβατική εκχύλιση

Η πειραματική διάταξη της συμβατικής εκχύλισης φαίνεται στην εικόνα 20. Η πρώτη ύλη μαζί με τον διαλύτη και έναν μαγνήτη τοποθετούνται στο δοχείο, το οποίο έχει διπλό τοίχωμα και θερμαίνεται καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Ο διαλύτης που εξατμίζεται συμπυκνώνεται στον ψυκτήρα και επιστρέφει πίσω στο δοχείο, διαδικασία που επαναλαμβάνεται μέχρι το πέρας της εκχύλισης.

Το πείραμα της συμβατικής εκχύλισης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον διαλύτη Αιθανόλη – Νερό 70-30 %, με αναλογία διαλύτη – πρώτης ύλης 1:10 και στην θερμοκρασία των 60 °C. Η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 10 ώρες.



Εικόνα 20. Πειραματική διάταξη συμβατικής εκχύλισης

## Ανάλυση εκχυλισμάτων

### Προσδιορισμός αντιοξειδωτική δράσης

#### Παρασκευή διαλύματος DPPH

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH (Ρίζα 2,2- διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου), διαλύεται 1.5 mg DPPH σε 50 mL μεθανόλης. Έπειτα αφήνεται για ανάδευση για 15 λεπτά σε σκοτεινό μέρος

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτική δράσης βασίζεται στην αντίδρασης της ελεύθερης ρίζας του DPPH με τα αντιοξειδωτικά μόρια και οδηγούν αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ώδες σε υποκίτρινο χρώμα [57].

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Ρίζα 2,2- διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH) (Αριθμός CAS: 1896-66-4, Προμηθευτής: Alfa Aesar, Καθαρότητα 95 %)
- Μεθανόλη
- Εκχυλίσματα βιομάζας Ulva

60 – 100 mg ξηρού εκχυλίσματος διαλύονται σε 2 – 2.5 mL μεθανόλης και με βάση αυτό δημιουργούνται διαλύματα με συγκεντρώσεις 1:2, 1:4 και 1:8.



*Εικόνα 21. Από αριστερά προς τα δεξιά (με αύξουσα σειρά) οι αραιώσεις για το πείραμα του συν - διαλύτη*

Κατά την διαδικασία της φωτομέτρησης, πραγματοποιείται αρχικά μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου UV – Vis UV – 1900i (Shimadzu Corporation, Ιαπωνία) στα 515 nm με δείγμα καθαρής μεθανόλης. Έπειτα, δημιουργούνται τυφλά δείγματα της εκάστοτε αραιώσης με την ανάμειξη 3.9 mL μεθανόλης και 0.1 mL των δειγμάτων και φωτομετρούνται. Στη συνέχεια φωτομετρούνται 3.9 mL διαλύματος DPPH, πρώτα χωρίς το δείγμα και μετά με 0.1 mL της εκάστοτε αραιώσης, αφήνονται για 30 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο τέλος πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης του εκάστοτε μίγματος.

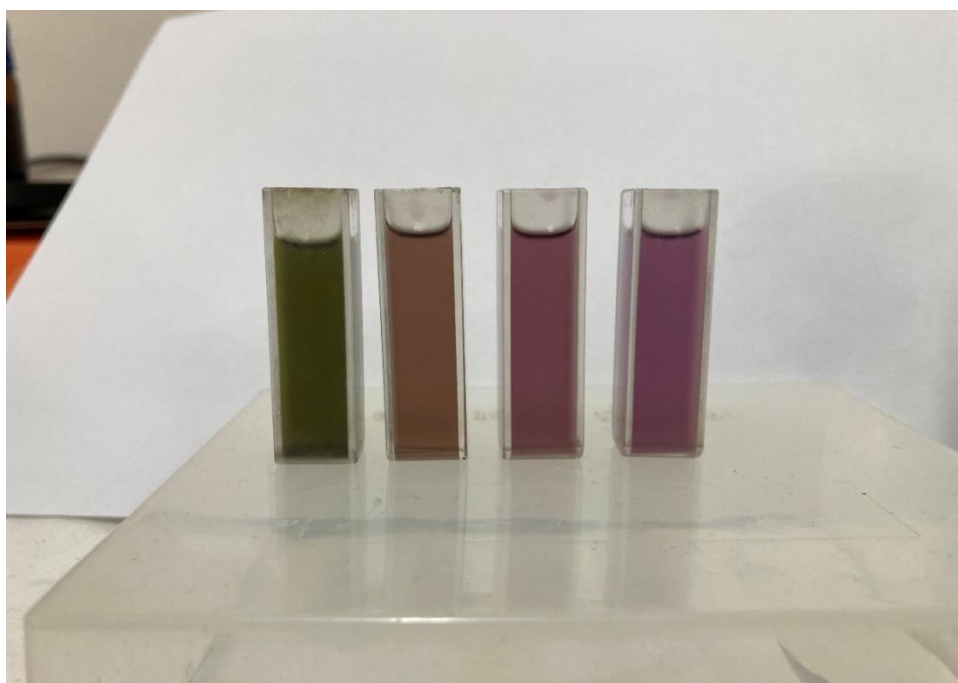
Το ποσοστό της ρίζας που εξουδετερώνεται υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\% SCA = 1 - \frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{control}} * 100 \quad (2)$$

όπου,  $Abs_{sample}$ ,  $Abs_{blank}$ , και  $Abs_{control}$  η απορρόφηση του δείγματος εκχυλίσματος, του τυφλού και του δείγματος ελέγχου, αντίστοιχα.

Η τιμή  $IC_{50}$  για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε γραφικά με γραφική παράσταση του ποσοστού εξαφάνιση της DPPH ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Υπολογίζεται η κλίση της συνάρτησης (slope) και το σημείο στο οποίο η συνάρτηση θα τέμνει τον άξονα  $y$  (intercept) και εξάγεται η τιμή του  $IC_{50}$  με βάση την παρακάτω εξίσωση [57]:

$$IC50 \left( \frac{mg\epsilon\kappa\chi}{mL} \right) = \frac{50 - Intercept}{Slope} \quad (3)$$



Εικόνα 22. Αντίδραση αντιοξειδωτικών με DPPH μετά από 30'

### Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού περιεχομένου

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Αριθμός CAS: 497-19-8)
- Folin Ciocalteu Reagent (Προμηθευτής: Carlo Erba Reagents, Καθαρότητα  $\geq 99,5$ )
- Απιονισμένο νερό (Αριθμός CAS: 7732-18-5, Προμηθευτής: Fisher Chemical, Καθαρότητα  $\geq 99.9$  %)

#### Διάλυμα ανθρακικού νατρίου

Για την ανάλυση των φαινολικών οξέων, είναι αναγκαία η παρασκευή ανθρακικού διαλύματος. Ζυγίζονται 200 g άνυδρου  $Na_2CO_3$  και προστίθονται σε 800 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό συνεχή ανάδευση και έπειτα αφήνεται να ψυχθεί. Ύστερα προστίθονται μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου  $Na_2CO_3$  και το διάλυμα

αφήνεται σε ηρεμία για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστίθονται 200 mL απιονισμένου νερού και αποθηκεύεται στο ψυγείο.

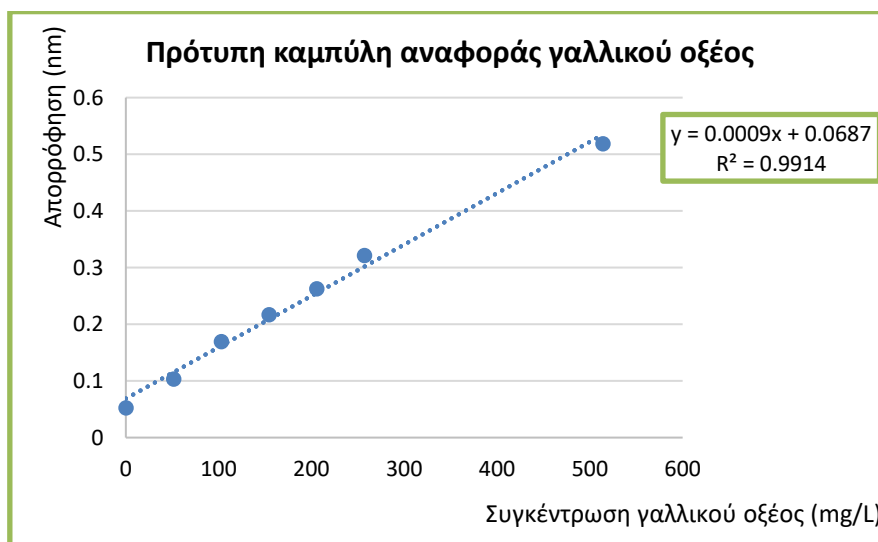
### Διαδικασία ανάλυσης

Αρχικά προστίθονται σε σωληνάκια 100 mL δείγματος ( παρόμοια με αυτά των αραιώσεων στην ανάλυση των αντιοξειδωτικών) και μετά 7.9 mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια, 500 μL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu και τα διαλύματα που δημιουργήθηκαν τοποθετούνται σε συσκευή Vortex και αφήνονται σε ηρεμία για 1 – 8 λεπτά. Τέλος προστίθονται 1.5 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , τοποθετούνται σε συσκευή Vortex, και αφήνονται σε ηρεμία είτε για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε για 30 λεπτά στους 40 βαθμούς [58].

Πραγματοποιείται μηδενισμός του φασματοφωτομετρου με απιονισμένο νερό, φωτομετράται το τυφλό δείγμα, το οποίο αντί για 100μL δείγματος έχει 100μL απιονισμένου νερού και τέλος τα δείγματα. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 765 nm και η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων εκφράζεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος [58].

### Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος:

50 mg Γαλλικού οξέος διαλύονται σε 90 mL απιονισμένου νερού μαζί με 10 mL αιθανόλης, ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα γαλλικού οξέος 0.5 mg/mL. Με βάση αυτό το διάλυμα δημιουργούνται διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 200, 250 και 500 mg/mL. Τα σχηματιζόμενα διαλύματα φωτομετρούνται στα 765 nm και δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς αντιστοιχίζοντας την απορρόφηση με την συγκέντρωση του κάθε δείγματος.



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

## Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών

Αντιδραστήρια:

- Ακετόνη
- Απιονισμένο νερό
- Εκχύλισματα μακροαλγών Ulva

Αρχικά, ζυγίζονται 5 mg εκχυλίσματος και διαλύονται σε 5 mL ακετόνης 90% (4.5 mL ακετόνης + 0.5 mL απιονισμένου νερού). Αφού ομογενοποιηθεί το διάλυμα σε συσκευή vortex, πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα μήκη κύματος των 664, 647, 630, 510 και 480 nm. Η ανάλυση λαμβάνει μέρος σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis UV-1900i (Shimadzu Corporation, Ιαπωνία).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, γίνεται χρήση των παρακάτω εξισώσεων για τον υπολογισμό των παρακάτω συγκεντρώσεων [59] [60]:

$$\text{Χλωροφύλλη A: } c_a = 11,85 * A_{664} - 1,54 * A_{647} - 0,08 * A_{630} \quad (4)$$

$$\text{Χλωροφύλλη B: } c_b = 21,03 * A_{647} - 5,43 * A_{664} - 2,66 * A_{630} \quad (5)$$

$$\text{Χλωροφύλλη Γ: } c_c = 24,52 * A_{630} - 1,67 * A_{664} - 7,60 * A_{647} \quad (6)$$

$$\text{Ολική συγκέντρωση χλωροφυλλών: } c_{chl} = C_a + C_b + C_c \quad (7)$$

$$\text{Ολική συγκέντρωση καροτενοειδών: } c_{car} = 7,60 * A_{480} - 1,49 * A_{510} \quad (8)$$

$$C_i = 10^3 * \frac{c_i}{C_{sample}}, i = chl, car \quad (9)$$

Οι συγκεντρώσεις  $C_a$ ,  $C_b$ ,  $C_c$ ,  $C_{chl}$ ,  $C_{car}$  είναι σε  $\mu\text{g/mL}$ , η συγκέντρωση  $C_{sample}$  είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ( $\text{gextr/mL}$ ) και  $C_{chl}$ ,  $C_{car}$  οι ζητούμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή ( $\text{mg/gextr}$ ).

## Σχεδιασμός πειραμάτων

Σκοπός των πειραμάτων της υπερκρίσιμης εκχύλισης στο μακροφύκος *Ulna* είναι η εύρεση των κατάλληλων λειτουργικών παραμέτρων για τη βέλτιστη απόδοση της διεργασίας. Οι παράμετροι αυτοί είναι η πίεση εκχύλισης ( $P_{ex}$ ), η θερμοκρασία εκχύλισης ( $T_{exp}$ ), η παροχή διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ ) ( $Q$ ) και τέλος η προσθήκη συν - διαλύτη. Σε κάθε πείραμα ορίστηκε να διέρχεται η ποσότητα των 12 kg  $CO_2$ , οπότε η χρονική διάρκεια των πειραμάτων ήταν διαφορετικής για κάθε ροή. Για παραδειγμα, τα πειράματα όπου η ροή ήταν 1 kg/h, το πείραμα ήταν 12ωρο, γινόταν σε διάστημα δύο ημερών, 6 ώρες την μια μέρα και 6 ώρες την αμέσως επόμενη.

Αρχικά εφαρμόστηκε ένας  $2^3$  παραγοντικός σχεδιασμός, όπου οι παράμετροι είναι 3 (πίεση, θερμοκρασία, ροή) και τα επίπεδα είναι δύο, ένα χαμηλό και ένα υψηλό. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν 4 κεντρικά πειράματα ώστε να βρεθούν οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων. Πραγματοποιήθηκαν σε  $P = 175 \text{ bar}$ ,  $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $Q = 1.75 \text{ kg/h}$ .

Παρακάτω παρουσιάζεται ο αντίστοιχος πίνακας με όλα τα πειράματα

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικό πίνακας όλων των πειραμάτων Υ.Ε

Πείραμα	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία ( $^\circ\text{C}$ )	Ροή (kg/h)
SFE - 1	100	40	1
SFE - 2	100	60	1
SFE - 3	100	40	2.5
SFE - 4	100	60	2.5
SFE CENTER 1	175	50	1.75
SFE CENTER 2	175	50	1.75
SFE CENTER 3	175	50	1.75
SFE CENTER 4	175	50	1.75
SFE - 5	250	40	1
SFE - 6	250	60	1
SFE - 7	250	40	2.5
SFE - 8	250	60	2.5
Συν - διαλύτης	250	60	1

Έπειτα ακολουθεί αναλυτικό πίνακας με τα αποτελέσματα των κεντρικών πειραμάτων της Υ.Ε



Πίνακας 6. Κεντρικά πειράματα Υ.Ε

Πείραμα	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Ροή (kg/h)	Απόδοση %	IC <sub>50</sub> (mg / mL)	TPC (mg <sub>GAE</sub> / gβιομάζα)	Χλωροφύλλες (mg / gβιομάζας)	TCC (mg / gβιομάζα)
SFE CENTER - 1	175	50	1.75	9.97%	35.66	0.91	3.79	1.00
SFE CENTER 2	175	50	1.75	9.37%	44.91	0.69	3.34	0.94
SFE CENTER 3	175	50	1.75	9.43%	43.14	0.96	3.84	1.01
SFE CENTER 4	175	50	1.75	10.17%	50.11	1.00	3.62	0.92
M.O				9.73%	43.46	0.89	3.65	0.97
STDEV				0.40%	5.98	0.14	0.23	0.05

Εξίσωση υπολογισμού μέσου όρου:

$$M.O = \frac{\sum X}{N} \quad (10)$$

Εξίσωση υπολογισμού τυπικής απόκλισης (STDVE):

$$\sigma = \text{SQRT} \left( \sum (X_i - \mu)^2 / N \right) \quad (11)$$

## Αποτελέσματα – Σχολιασμός

### Πειράματα SFE

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων Υ.Ε:

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας πειραμάτων

Πείραμα	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Ροή (kg/h)	Απόδοση (% w/w)	IC50 (mg <sub>εκχ</sub> / mL)	TPC (mgGAE / γβιομάζας)	Συγκέντρωση χλωροφυλλών (mg / γβιομάζας)	TCC (mg / γβιομάζας)
SFE-1	100	40	1	6.85%	135.86	0.00	0.34	0.11
SFE-2	100	60	1	7.79%	93.95	0.00	0.77	0.07
SFE-3	100	40	2.5	7.98%	76.58	1.00	1.21	0.23
SFE-4	100	60	2.5	9.06%	126.03	0.00	0.78	0.12
SFE-5	250	40	1	8.00%	43.96	0.77	4.34	0.63
SFE-6	250	60	1	10.17%	31.56	1.43	6.34	1.10
SFE-7	250	40	2.5	8.34%	51.04	0.41	4.55	0.67
SFE-8	250	60	2.5	10.13%	39.12	0.97	4.38	0.9
Συν - διαλύτης	250	60	1	10.92%	13.67	3.28	8.39	1.14

### Απόδοση εκχύλισης

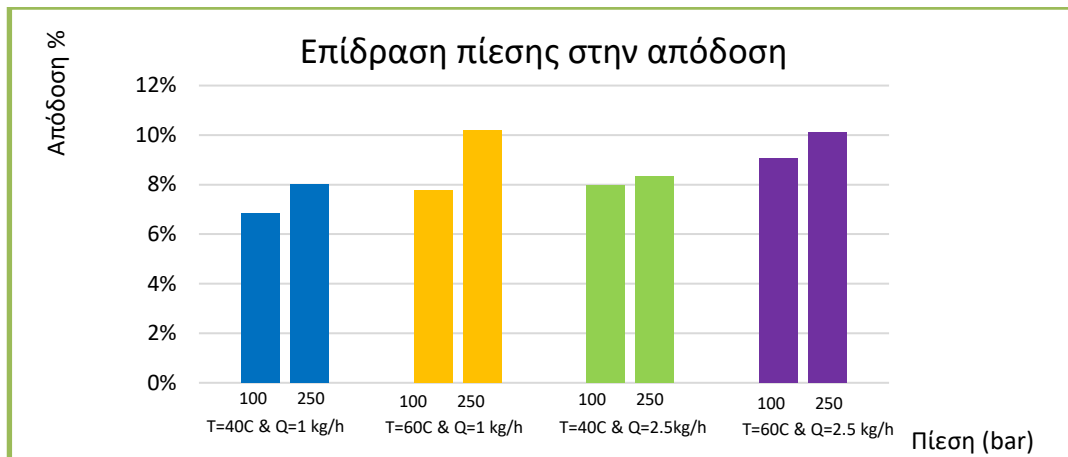
Η απόδοση του κάθε πειράματος υπολογίστηκε με βάση την απώλεια βάρους του εκχυλιστήρα ύστερα από κάθε πείραμα. Ο τύπος είναι ο παρακάτω:

$$\text{Απόδοση \%} = \frac{\text{Αρχικό βάρος εκχυλιστήρα} - \text{Τελικό βάρος εκχυλιστήρα}}{\text{Μάζα πρώτης ύλης}} \quad (12)$$

Το σφάλμα της απόδοσης μέσα από τον επαναλαμβανόμενο πειραματικό σχεδιασμό είναι ± 0.40%.

### Επίδραση της πίεσης

Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη απόδοση, **10.17 %**, επιτυγχάνεται στο πείραμα SFE - 6, όπου η πίεση είναι 250 bar, η θερμοκρασία 60°C και η ροή 1 kg/h. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς το πείραμα διενεργήθηκε υπό τις πιο έντονες συνθήκες, δηλαδή υψηλή πίεση και υψηλή θερμοκρασία. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα Απόδοσης % - πίεσης το οποίο φανερώνει την επίδραση της πίεσης στην απόδοση της εκχύλισης:

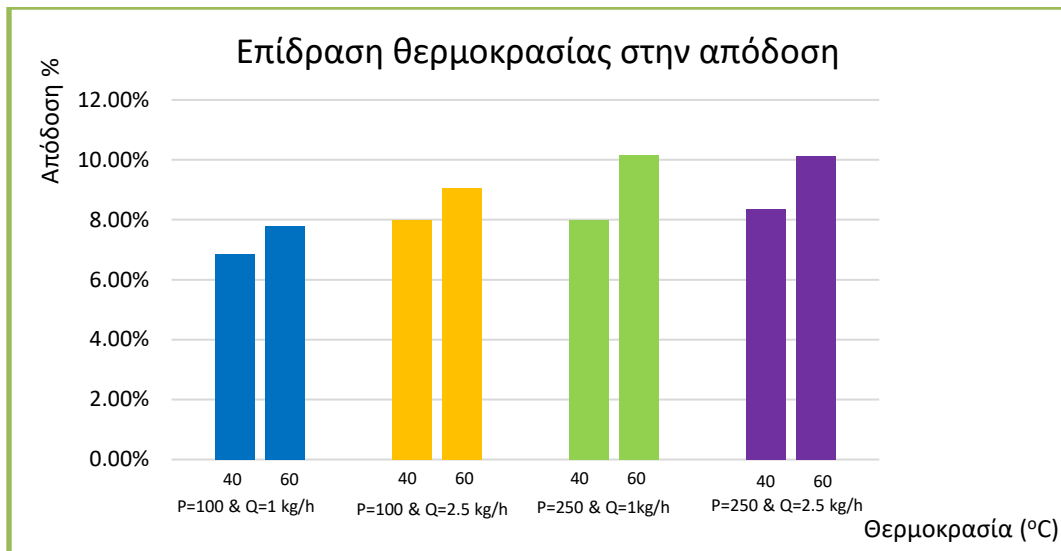


Διάγραμμα 2. Επίδραση πίεσης στην απόδοση

Φαίνεται ότι η αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία επιφέρει αύξηση της πυκνότητας του CO<sub>2</sub> με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η διαλυτική του ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα κιάλας, η επίδρασή της είναι εντονότερη στην χαμηλή ροή. Για αυτόν τον λόγο εκχυλίζονται παραπάνω ουσίες, πράγμα που οδηγεί στην αύξηση της συνολικής απόδοσης [61]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από διάφορα επιστημονικά άρθρα τα οποία σχετίζονται τόσο με μακροάλγη όσο και με μικροάλγη [62] [63] [64].

### Επίδραση της θερμοκρασίας

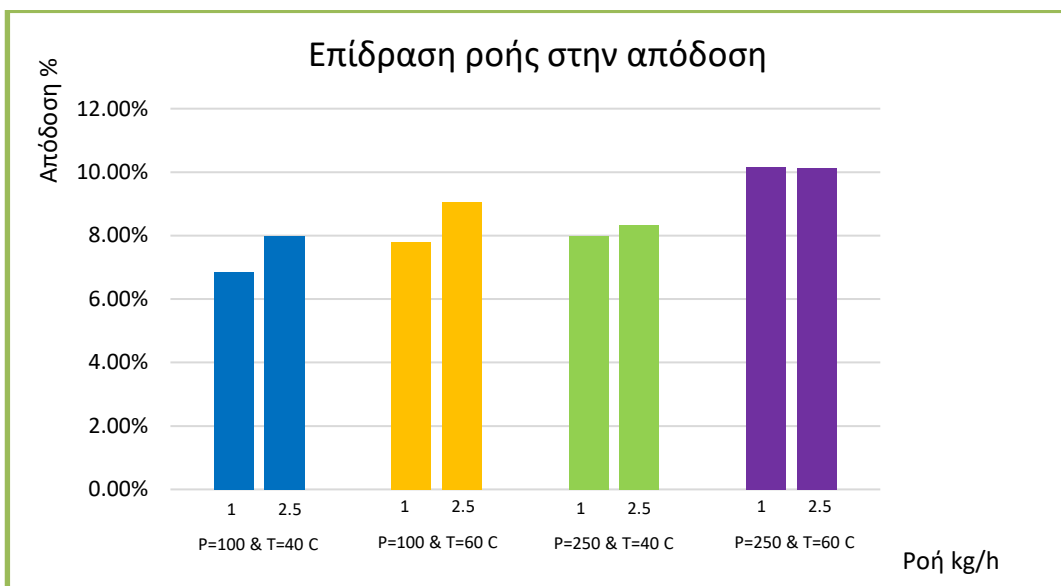
Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασία στην απόδοση (Διάγραμμα 4), φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση αυξάνει την ποσότητα του εκχυλίσματος. Αυτό οφείλεται σε έναν ιδιαίτερο μηχανισμό που έχουν τα συστήματα με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>. Ειδικότερα αυτό που συμβαίνει είναι ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνονται οι τάσεις ατμών των υπό διάλυση ουσιών και ταυτόχρονα μειώνεται η διαλυτική ικανότητα του διαλύτη λόγω μείωσης της πυκνότητάς του (“crossover phenomena”) [65]. Ο μηχανισμός αυτός έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να προκαλέσει αύξηση της απόδοσης, όπως στο μικροάλγος *Chlorella Vulgaris* [64] αλλά και μείωση της απόδοσης όπως στην περίπτωση του μικροάλγους *Aurantiochytrium sp.* [66], του μικροάλγους *Chlorella pyrenoidosa* [67] και της μαύρης πιπεριάς [68] ανάλογα με το ποιος από τους δύο παράγοντες κυριαρχεί στη δεδομένη πίεση. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι στα πειράματα της Ulva η αύξηση της τάσης ατμών των διαλυμένων ουσιών κυριάρχησε ενάντια στην μείωση της πυκνότητας του CO<sub>2</sub> με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης. Ακόμα, η επίδραση της θερμοκρασίας είναι μεγαλύτερη στη χαμηλή ροή όπως και για την πίεση αλλά σε μικρότερο βαθμό.



Διάγραμμα 3. Επίδραση θερμοκρασίας στην απόδοση

### Επίδραση της ροής

Στο κομμάτι της επίδρασης της ροής στην απόδοση, παρατηρείται από το διάγραμμα 5 ότι με αύξηση της ροής του CO<sub>2</sub> αυξάνεται και η συνολική απόδοση της εκχύλισης. Αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς η αύξηση της ροής μειώνει την αντίσταση κατά την μεταφορά της μάζας [64]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στις υψηλές πιέσεις φαίνεται η επίδραση της ροής να μην είναι τόσο σημαντική όσο στις χαμηλές.



Διάγραμμα 4. Επίδραση ροής στην απόδοση

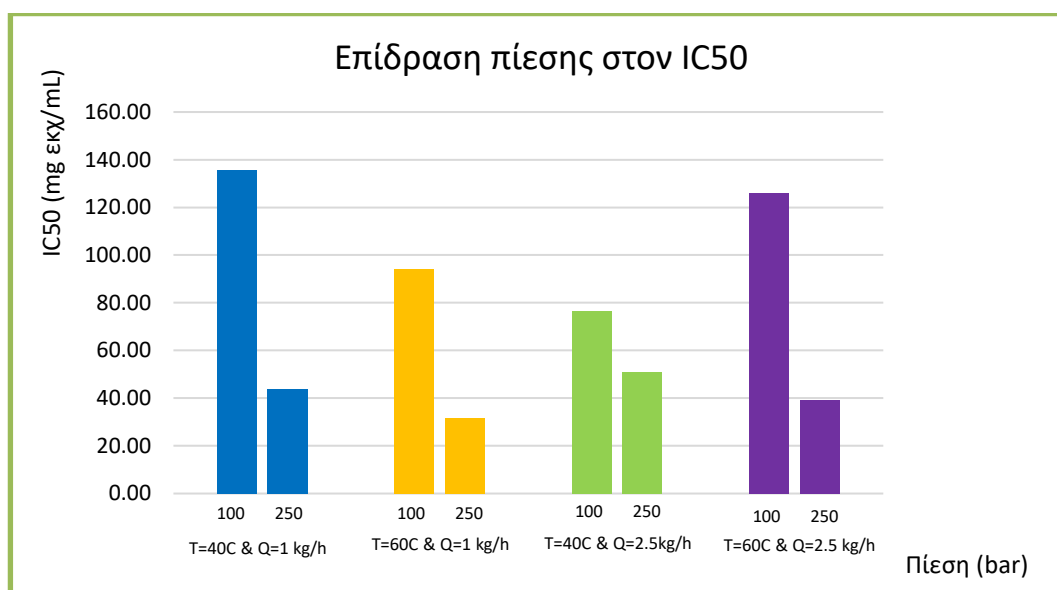
## Αντιοξειδωτική δράση

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης υπολογίζεται ο συντελεστής IC<sub>50</sub>. Όσο πιο χαμηλός είναι ο συντελεστής αυτός, τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το εξεταζόμενο εκχύλισμα.

Παρατηρείται ότι την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση την εμφανίζει το πείραμα SFE-6 (250 bar, 60°C, 1 kg/h) με IC<sub>50</sub> = **31.56 mg<sub>εκχ</sub> / mL**. Στην βιβλιογραφία για το καφέ μαρκοάλογος *Dictyopteris polyprodioides* έχει βρεθεί ότι σε 300bar, 60 °C, 24 mL / min ο IC<sub>50</sub> = 25.55 mg / mL [69], αποτέλεσμα το οποίο είναι λογικό καθώς η εκχύλιση έγινε σε μεγαλύτερη πίεση.

## Επίδραση της πίεσης

Σύμφωνα με το διάγραμμα 6 φαίνεται ότι η αύξηση της πίεσης επιφέρει μείωση του IC<sub>50</sub> άρα και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος. Αναμενόμενο, καθώς όπως έχει προαναφερθεί με την αύξηση της πίεσης αυξάνεται και η πυκνότητα του CO<sub>2</sub> άρα και η διαλυτική του ικανότητα. Αυτό συνεπάγεται την εκχύλιση περισσότερων πολύτιμων βιοδραστικών ουσιών και άρα καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Επίσης έχει αναφερθεί ότι ουσίες πλούσιες σε αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι ευκολότερα διαλυτές στο SC - CO<sub>2</sub> σε υψηλές πιέσεις άνω των 300 bar [69].

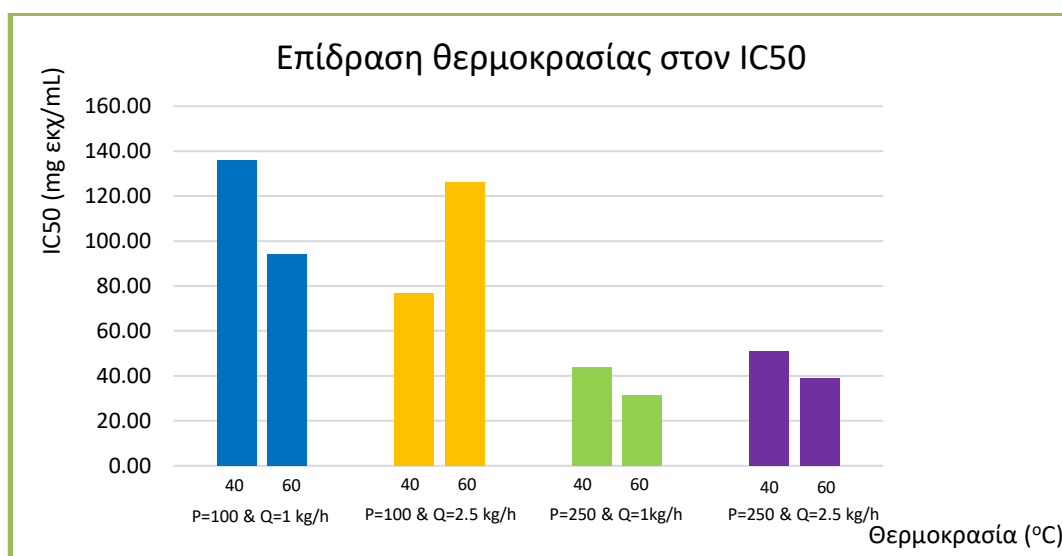


Διάγραμμα 5. Επίδραση πίεσης στον IC50

## Επίδραση θερμοκρασίας

Παρατηρείται ότι στην υψηλή πίεση, η αντιοξειδωτική δράση βελτιώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (SFE – 6 & SEF – 8). Το ίδιο συμβαίνει και στα πειράματα με χαμηλή πίεση και χαμηλή ροή (SFE-2). Αντιθέτως, στα πειράματα με χαμηλή πίεση και υψηλή ροή ο IC<sub>50</sub> φαίνεται να αυξάνεται σε μεγαλύτερη θερμοκρασία. Αυτό υπάρχει μια περίπτωση να οφείλεται στον μηχανισμό που αναφέρθηκε και παραπάνω (“crossover phenomena”). Ειδικότερα, μπορεί στην συγκεκριμένη περίπτωση, η μείωση της πυκνότητας του SC - CO<sub>2</sub> (λόγω αύξησης θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση) παίζει σημαντικότερο ρόλο από την αύξηση των ατμών της πρώτης ύλης [70]. Ενδεχομένως να παίζει ρόλο και η υψηλή ροή, δηλαδή να συνεκχυλίζονται λιγότερο δραστικές ουσίες σε μεγαλύτερη ποσότητα και να μειώνεται η αντιοξειδωτική δράση.

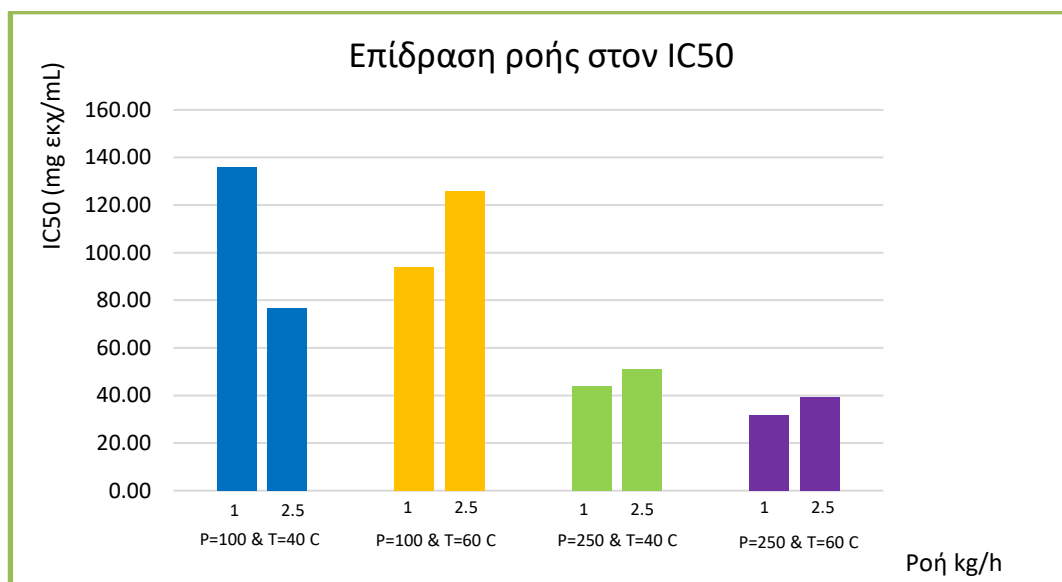
Βιβλιογραφικά, αύξηση του συντελεστή IC<sub>50</sub> με αύξηση της θερμοκρασίας έχει παρατηρηθεί και για το μικροάλγος *Chlorella Vulgaris* [64] και για τους σπόρους του φυτού γαϊδουράγκαθου [71].



Διάγραμμα 6. Επίδραση θερμοκρασίας στον IC<sub>50</sub>

### Επίδραση της ροής

Η υψηλή ροή CO<sub>2</sub> στις υψηλές πιέσεις φαίνεται να μην ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Το ίδιο συμβαίνει και για το πείραμα SFE – 2. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η μεγάλη ροή του SC - CO<sub>2</sub> ευνοεί την εκχύλιση και μη αντιοξειδωτικών ενώσεων. Βιβλιογραφικά έχει παρατηρηθεί αύξηση του IC<sub>50</sub> με αύξηση της ροής και για την *Chlorella Vulgaris* [64].

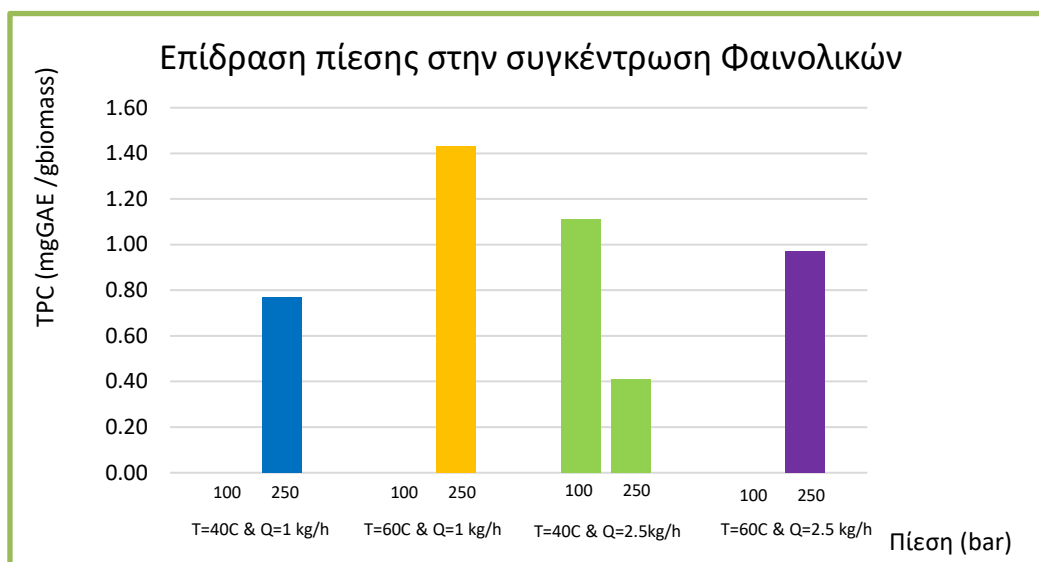


Διάγραμμα 7. Επίδραση ροής στον IC<sub>50</sub>

## Συγκέντρωση φαινολικών οξέων

### Επίδραση της πίεσης

Η παρουσία φαινολικών οξέων στα εκχυλίσματα από το μακροάλγος *Ulva* φαίνεται ότι ευνοείται στις υψηλές πιέσεις, εκτός από τα πειράματα με  $T = 40^{\circ}\text{C}$  και  $Q = 2.5 \text{ kg/h}$ . Ειδικότερα στο πείραμα SFE – 6 παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών οξέων η οποία είναι  $\text{TPC} = 1.43 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{βιομάζας}}$ . Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η αύξηση της πίεσης



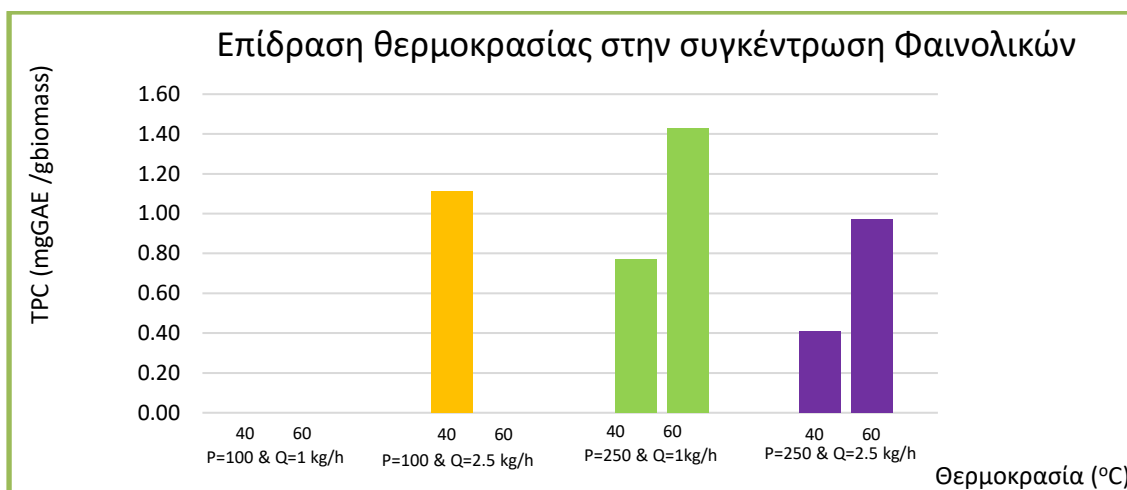
Διάγραμμα 8. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση Φαινολικών

ευνοεί την αύξηση της συγκέντρωσης φαινολικών.

Για το καφέ μακροάλγος *Sargassum horneri* έχει βρεθεί ότι με διαλύτες SC - CO<sub>2</sub> & αιθανόλη στους 40°C, στα 250 bar και ροή 1.62 kg/h η συγκέντρωση φαινολικών είναι  $0.64 \pm 0.02 \text{ mg/g}_{\text{βιομάζας}}$  [72]. Σε παραπλήσιες συνθήκες αλλά με διάλυτη μόνο το SC – CO<sub>2</sub> και ροή 1 kg/h, στο πείραμα SFE – 5, η συγκέντρωση είναι  $0.77 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{βιομάζας}}$ . Ακόμα έχει δειχθεί ότι για το καφέ μακροάλγος *Laminaria japonica* στα 300 bar και στους 40 °C, το TPC (Total Phenolic Content) είναι  $2.15 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}$ . Τέλος για το *Dictyopteris polyrodoides*, ένα καφέ μακροάλγος, έχει αναφερθεί ότι σε 400 bar, 25 °C και 24 mL/min, το εκχύλισμα έχει  $\text{TPC} = 2.54 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}$  [73].

### Επίδραση θερμοκρασίας

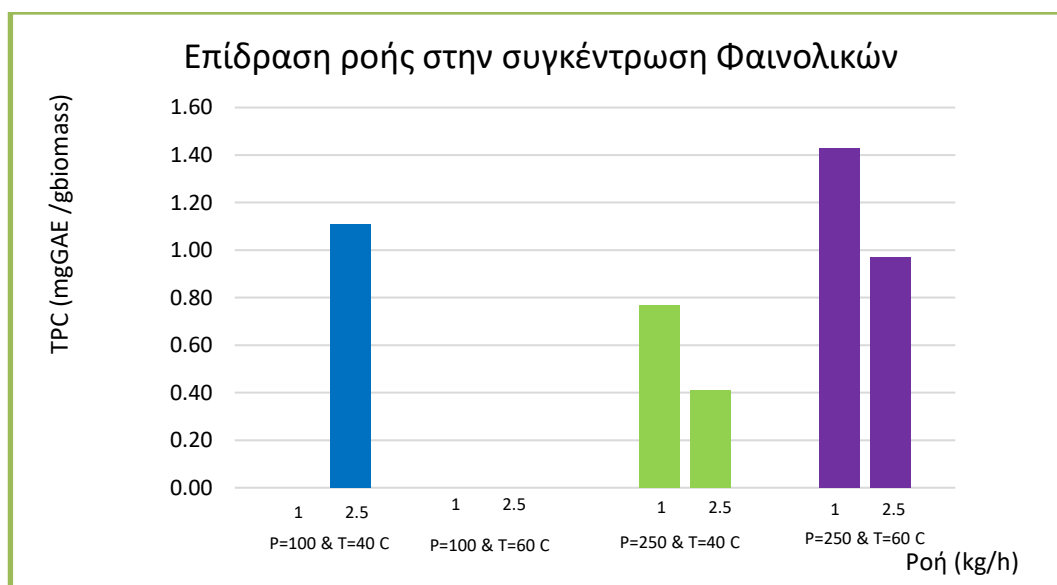
Πέραν των υψηλών πιέσεων, και οι υψηλές θερμοκρασίες δρουν θετικά στην αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών οξέων στα πειράματα των υψηλών πιέσεων και όχι σε αυτά των 100 bar (Διάγραμμα 10). Σε μια έρευνα για το πράσινο μακροάλγος *Cladophora glomerat*, η εκχύλιση φαινολικών ουσιών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας και σε συνθήκες 200 bar και 40 °C είχαν τιμή  $5.63 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{βιομάζας}}$ . [74]. Γενικά είναι δύσκολο να προβλεφθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στις φαινολικές ουσίες λόγω του ότι είναι πολύ θερμοευαίσθητες [75].



*Διάγραμμα 9. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση φαινολικών*

### Επίδραση της ροής

Η αύξηση της ροής φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών. Με την αύξηση της ροής του CO<sub>2</sub> ενώ αυξάνεται η απόδοση της διεργασίας φαίνεται ότι ευνοείται η εκχύλιση άλλων ουσιών και όχι των φαινολικών οξέων.



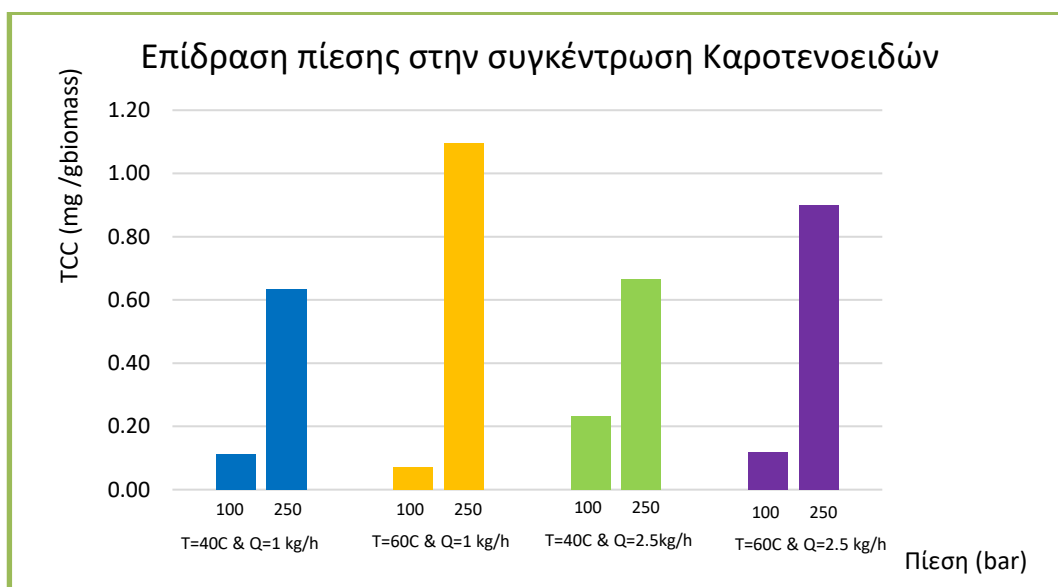
*Διάγραμμα 10. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση φαινολικών*

### Συγκέντρωση Καροτενοειδών

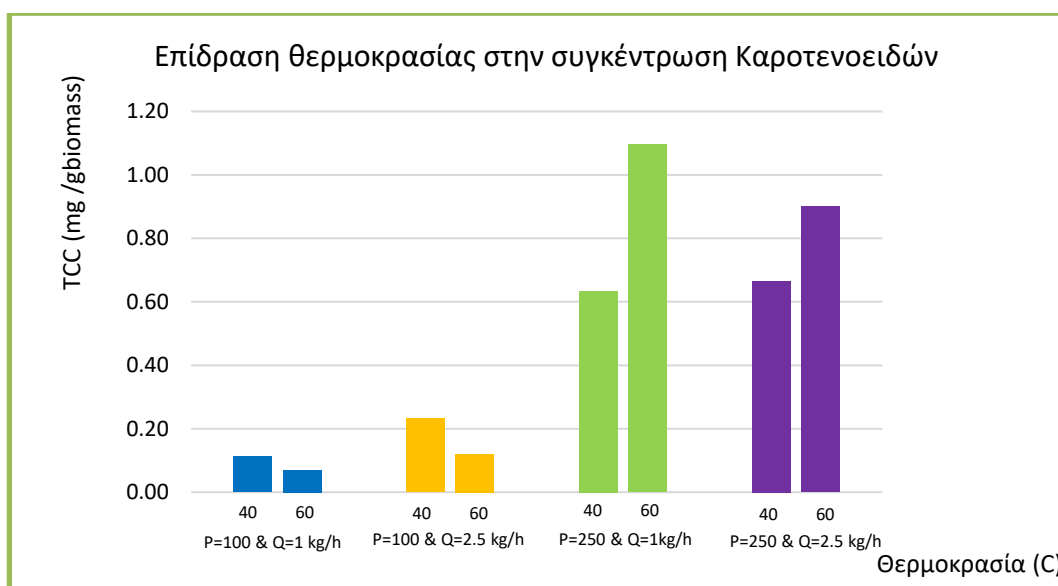
Η μεγαλύτερη συγκέντρωση καροτενοειδών εντοπίζεται στο πείραμα SFE – 6, με **TCC = 1.10 mg / gβιομάζας** ή **10.78 μg / mL**. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι για την *Ulna lactuca* στα 300 bar, 55°C και 1.2 kg/h το TCC = 0.016 mg / g [76], τιμή πολύ μικρότερη από την πειραματική μας. Σε ένα άλλο άρθρο για την *Ulna flexuosa*, στα 300 bar, 40 °C και για μία ώρα εκχύλισης, το TCC = 0.9 μg / mL, τιμή που και αυτή είναι πολύ μικρότερη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός των διαφορετικών καλλιιεργειών από τις οποίες έχει προέλθει η εκάστοτε βιομάζα.



Από τα παρακάτω διαγράμματα, φαίνεται ότι η αύξηση πίεσης και θερμοκρασίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση των καρροτενοειδών οδηγώντας σε αύξηση της στο εκχύλισμα. Ωστόσο, στις χαμηλές πιέσεις εμφανίζεται το φαινόμενο “crossover” για την επίδραση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα στις χαμηλές πιέσεις, η μείωση της διαλυτικής ικανότητας του SC-CO<sub>2</sub> λόγω αύξησης της θερμοκρασίας, φαίνεται να παίζει σημαντικότερο ρόλο από την αύξηση της τάσεως ατμών των καρροτενοειδών. Από την άλλη στις υψηλές πιέσεις γίνεται το ανάποδο. Όπως και παραπάνω, έτσι κι εδώ το *Cladophora glomerat* εμφάνισε την ίδια συμπεριφορά [74].

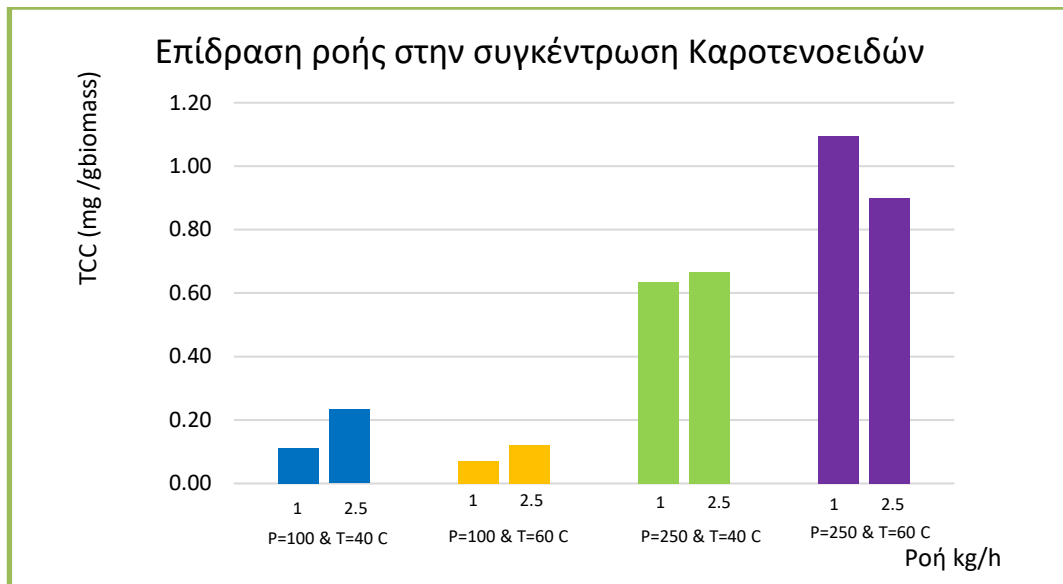


Διάγραμμα 11. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση καρροτενοειδών



Διάγραμμα 12. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση καρροτενοειδών

Όσον αφορά τη ροή, η αύξησή της φαίνεται να έχει θετική επίδραση στα καρροτενοειδή σε όλα τα πειράματα εκτός από το πείραμα που έγινε σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες.



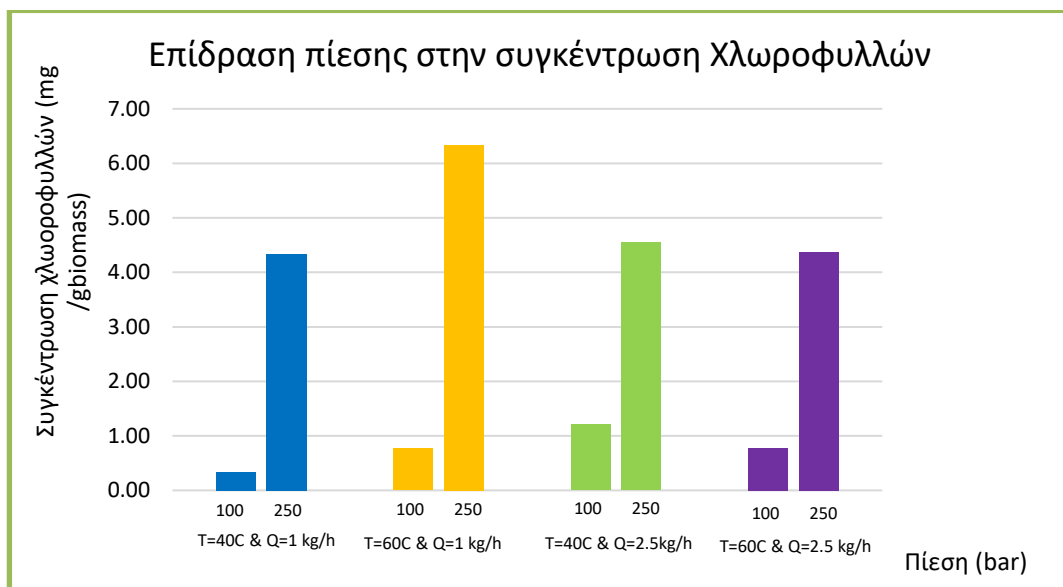
*Διάγραμμα 13. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση καροτενοειδών*

### Συγκέντρωση χλωροφυλλών

Η υψηλότερη συγκέντρωση χλωροφυλλών είναι **6.34 mg / gβιομάζας** και συναντάται και αυτή στο πείραμα SFE – 6.

### Επίδραση της πίεσης

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρατηρείται η σημαντική επίδραση της αύξησης της πίεσης στην συγκέντρωση των χλωροφυλλών, δεδομένου ότι με την αύξηση της πίεσης αυξάνεται η πυκνότητα του SC – CO<sub>2</sub> και κατά συνέπεια και η διαλυτική του ικανότητα.,

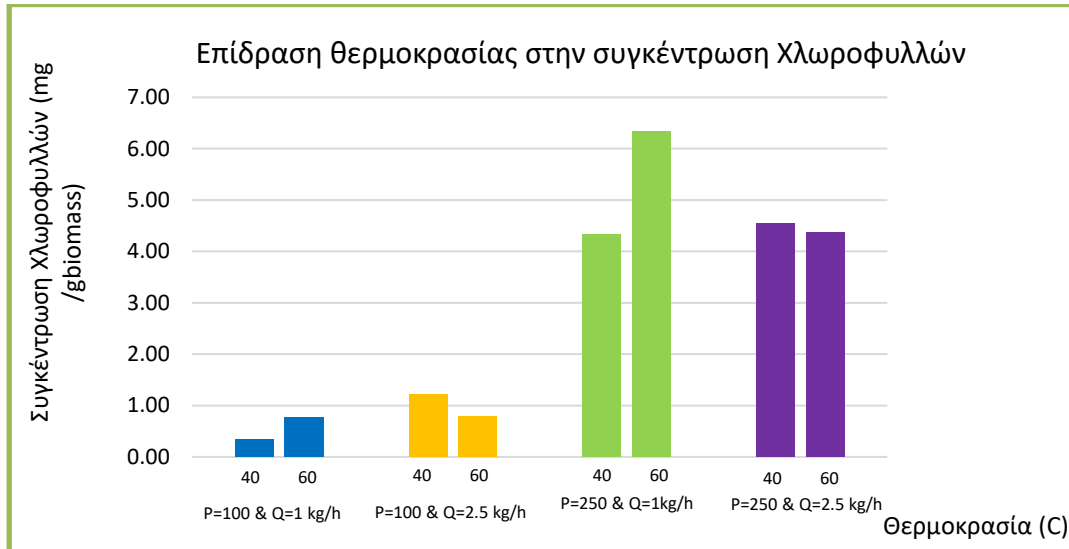


*Διάγραμμα 14. Επίδραση πίεσης στην συγκέντρωση χλωροφυλλών*

### Επίδραση της θερμοκρασίας

Παρατηρείται ότι στις χαμηλές ροές, η συγκέντρωση των χλωροφυλλών αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ενώ στις υψηλές συμβαίνει το αντίθετο. Επίσης στο πείραμα SFE – 6 φαίνεται η μεγάλη επίδραση της θερμοκρασίας, γεγονός που δείχνει ότι η τάση ατμών

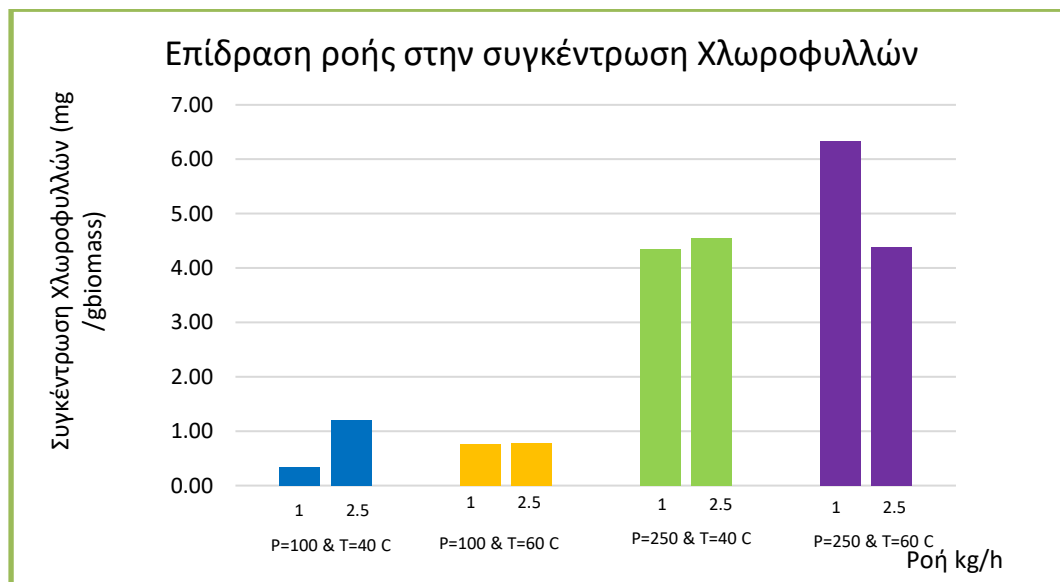
των χλωροφυλλών είχε σημαντικότερη επίδραση από την μείωση της διαλυτικής ισχύς του SC – CO<sub>2</sub> . Παρόμοιες συμπεριφορές με αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών έχουν παρατηρηθεί και για το μικροάλγος *Dunaliella salina* [77] και για το *Synechococcus* sp. [78].



Διάγραμμα 15. Επίδραση θερμοκρασίας στην συγκέντρωση χλωροφυλλών

### Επίδραση της ροής

Η αύξηση της ροής φαίνεται ότι στις ακραίες συνθήκες παίζει σημαντικό ρόλο αλλά στις υπόλοιπες όχι. Επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την επίδραση της.



Διάγραμμα 16. Επίδραση ροής στην συγκέντρωση χλωροφυλλών

## Συν - διαλύτης

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το πείραμα του συν – διαλύτη:

Πίνακας 8. Αποτελέσματα πειράματος συν - διαλύτη

Run	Πίεση (bar)	Θερμοκρασία (°C)	Ροή (kg/h)	Απόδοση (% w/w)	IC50 (mg <sub>ΕΚΧ</sub> / mL)	TPC (mg <sub>GAE</sub> / gβιομάζας)	Συγκέντρωση χλωροφυλλών (mg / gβιομάζας)	TCC (mg / gβιομάζας)
Συν - διαλυτης	250	60	1	10.92%	13.67	3.28	8.39	1.14

Το πείραμα του συν – διαλύτη πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με το πείραμα SFE – 6, όπου παρουσιάστηκαν οι καλύτερες μετρήσεις. Σαν συν – διαλύτης χρησιμοποιήθηκε 10 %κ.β. Et – OH.

Παρατηρείται ότι η χρήση του συν – διαλύτη παρουσιάζει πάρα πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης, αποτέλεσμα αναμενόμενο καθώς η αιθανόλη είναι πολική και η παρουσία της βοηθάει στην εκχύλιση πολικών ενώσεων. Κάτι τέτοιο δεν γινόταν με το SC – CO<sub>2</sub>, καθώς το CO<sub>2</sub> είναι άπολο [74]. Ακόμα μειώνεται σημαντικά ο συντελεστής IC<sub>50</sub>, δηλαδή το εκχύλισμα παρουσιάζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα πειράματα χωρίς την αιθανόλη.

Επίσης το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι αυξημένο, καθώς οι φαινολικές ενώσεις είναι πολικές [79].

Βιβλιογραφικά, για το κόκκινο μακροάλγος *G. Mammillaris* έχει βρεθεί ότι σε κοντινές συνθήκες λειτουργίας, 300 bar, 60°C και 8 % EtOH με ροή 0.4 kg/h CO<sub>2</sub>, το TPC = 3.79 mg<sub>GAE</sub> / mL και για 300 bar, 40°C και 8 % EtOH με ροή 0.4 kg/h CO<sub>2</sub>, το TPC = 3.641 mg<sub>GAE</sub> / mL [80]. Και οι δύο τιμές είναι κοντινές στο αποτέλεσμα που βρέθηκε για την *Ulva*.

Τέλος οι συγκεντρώσεις χλωροφυλλών και καροτενοειδών παρουσιάζουν και αυτές αύξηση.

## Πείραμα συμβατικής εκχύλισης

Η επιλογή των συνθηκών βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Θερμοδυναμικής & Φαινομένων Μεταφοράς με διαφορετική όμως βιομάζα.

Τα αποτελέσματα του πειράματος της συμβατικής εκχύλισης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 9. Αποτελέσματα πειράματος συμβατικής εκχύλισης*

Απόδοση (% w/w)	IC50 (mg <sub>ΕΚΧ</sub> / mL)	TPC (mg <sub>GAE</sub> / βιομάζας)	Συγκέντρωση χλωροφυλλών (mg / βιομάζας)	TCC (mg / βιομάζας)
10.1	67.18	0	0.36	0.043

Παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα του πειράματος δεν είναι τόσο ικανοποιητικά. Συγκρίνοντας τα με παρόμοια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς το 2022 για το μακροφύκος *Ulva*, αλλά σε παραπλήσιες συνθήκες, παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στις τιμές του TPC (μόνο αυτό είναι συγκρίσιμο καθώς μόνο αυτό αναλύθηκε με ίδιο πρωτόκολλο όπως εδώ) και μικρότερες στην απόδοση. Για παράδειγμα για τις ίδιες συνθήκες αλλά για 12 ώρες εκχύλισης, η απόδοση βρέθηκε 12 % αλλά η τιμή του TPC είχε μεγάλη διαφορά [81].

Οι μεγάλες διαφορές οφείλονται στο γεγονός ότι οι πρώτες ύλες προέρχονται από διαφορετικές καλλιέργειες. Επίσης, παρατηρείται ότι οι συνθήκες του πειράματος της συμβατικής εκχύλισης λογικά δεν είναι οι βέλτιστες και για αυτόν τον λόγο τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα και δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστή σύγκριση με τα πειράματα της Υ.Ε

## Μοντελοποίηση Αποτελεσμάτων – Στατιστική Ανάλυση

Με τη βοήθεια του προγράμματος Design Expert v13 trial version (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) πραγματοποιήθηκε μελέτη και στατιστική ανάλυση της επίδρασης των λειτουργικών παραμέτρων στην απόδοση, την συγκέντρωση των καροτενοειδών και των χλωροφυλλών για τα πειράματα που διεξήχθησαν. Για τον συντελεστή IC<sub>50</sub> και το φαινολικό περιεχόμενο, τα μοντέλα δεν κατάφεραν να πετύχουν συσχέτιση σε απόδεκτο επίπεδο.

### Απόδοση

Στο κομμάτι της απόδοσης επιλέχθηκε το inverse μοντέλο για την ανάλυση του συστήματος. Επίσης επιλέχθηκε η επίδραση της πίεσης (P), της θερμοκρασίας (T), της ροής (F), του γινομένου πίεσης – θερμοκρασίας (T - P) και του γινομένου πίεσης – ροής (P - F). Οι πρώτες τρεις είχαν την μεγαλύτερη συνεισφορά ενώ οι άλλες δύο την μικρότερη.

Για την ανάλυση πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA μέσω του Design Expert. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στους παρακάτω δύο πίνακες:

Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο της απόδοσης

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F - Value	p - value
Model	0.0018	5	0.0004	29.23	0.0010
A – Pressure	0.0006	1	0.0006	47.15	0.0010
B - Temperature	0.0008	1	0.0008	65.75	0.0005
C - Feed	0.0002	1	0.0002	19.13	0.0072
AB	0.0000	1	0.0000	2.38	0.1834
AC	0.0001	1	0.0001	11.73	0.0187
Curvature	0.0007	1	0.0007	56.58	0.0007
Lack of Fit (LOF)	9.312E-06	2	4.656E-06	0.2678	0.7816

Πίνακας 11. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο της απόδοσης

R <sup>2</sup>	0.9669
Adjusted R <sup>2</sup>	0.9338
Predicted R <sup>2</sup>	0.8699

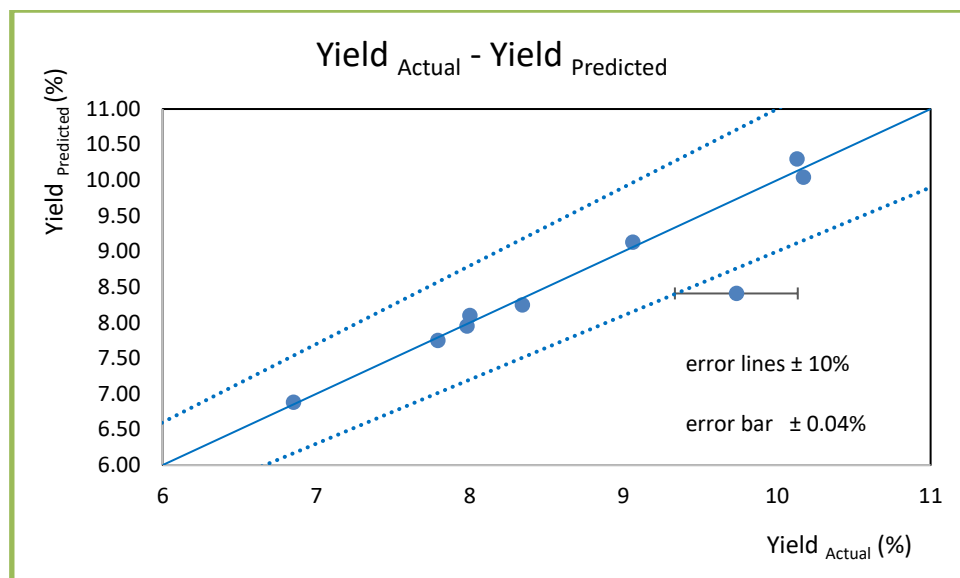
Παρατηρείται στον πίνακα 8, ότι  $F = 18.52$ , γεγονός που δηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Ακόμη, οι επιδράσεις της πίεσης (A), της θερμοκρασίας (B), της ροής (C) και του γινομένου πίεσης – ροής (AC) είναι σημαντικές καθώς  $p < 0.05$ . Την πιο σημαντική επίδραση την έχει η θερμοκρασία και η πίεση. Από την άλλη η επίδραση του γινομένου πίεσης – θερμοκρασίας δεν είναι τόσο σημαντική. Επίσης η τιμή του LOF = 0.2678 δείχνει ότι υπάρχει ασημαντότητα σχετικά με το σφάλμα.

Από τον πίνακα 9, παρατηρείται ότι  $R^2 = 0.9669$ , τιμή που δηλώνει την καλή προσαρμογή του μοντέλου. Επίσης φαίνεται και η καλή αξιοπιστία του μοντέλου από τις τιμές των “Adjusted R<sup>2</sup>” και “Predicted R<sup>2</sup>” που δεν έχουν υψηλή διαφορά (<0.2) και βρίσκονται σε λογική συμφωνία.

Η ANOVA χρησιμοποιήθηκε και για τον υπολογισμό των συντελεστών της εξίσωσης που περιγράφει το μοντέλο:

$$\frac{1}{Yield} = 0.1190 - 0.0085 * P - 0.0101 * T - 0.0054 * F - 0.0019 * T * P + 0.0042 * P * F \quad (13)$$

Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα των προβλεπόμενων τιμών του μοντέλου έναντι των πειραματικών. Παρατηρείται υψηλή συγγένεια μεταξύ προβλεπόμενων και πειραματικών δεδομένων, εκτός από του κεντρικού σημείου, γεγονός που σε συνδυασμό με τις τιμές των  $R^2$ , φανερώνει την υψηλή ακρίβεια του μοντέλου.



Διάγραμμα 17. Διάγραμμα προβλεπόμενων τιμών έναντι πειραματικών

## Καροτενοειδή

Στα καροτενοειδή επιλέχθηκε ένα γραμμικό μοντέλο για την ανάλυση. Οι επιδράσεις της πίεσης, της θερμοκρασίας και του γινομένου τους επιλέχθηκαν καθώς ήταν αυτές που είχαν την μεγαλύτερη συνεισφορά.

Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο των καροτενοειδών

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F - Value	p - value
Model	1.09	3	0.3624	72.22	<0.0001
A – Pressure	0.9591	1	0.9591	191.14	<0.0001
B - Temperature	0.0378	1	0.0378	7.54	0.0287
AB	0.0903	1	0.0903	18.00	0.0038
Curvature	0.6370	1	0.6370	126.95	<0.0001
Lack of Fit (LOF)	0.0293	4	0.0073	3.73	0.1539

Πίνακας 13. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο των καροτενοειδών

$R^2$	0.9687
Adjusted $R^2$	0.9553
Predicted $R^2$	0.8864

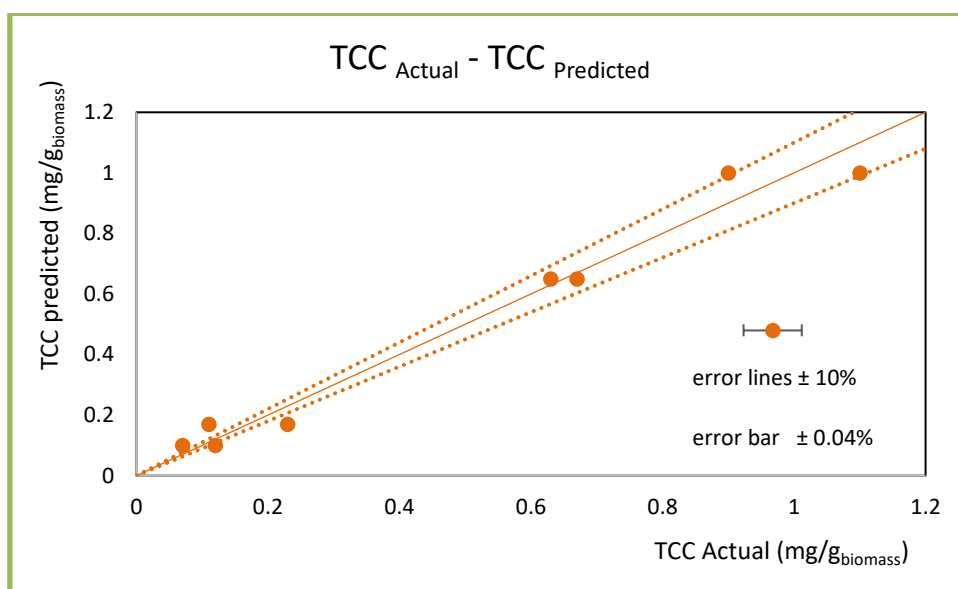
Από τον πίνακα 10 φαίνεται ότι υπάρχει σημαντικότητα στο μοντέλο αφού  $F = 72.22$ . Επιπλέον από τις τιμές των  $p$ , παρατηρείται ότι οι επιδράσεις της πίεσης (A), της θερμοκρασίας (B) και του γινομένου τους (AB) είναι εξίσου σημαντικές αφού  $p < 0.05$ . Ακόμη η τιμή του LOF = 3.73 παρουσιάζει την ασημαντότητα που υπάρχει σχετικά με τα σφάλματα.

Όσον αφορά τον πίνακα 14 η υψηλή τιμή του  $R^2$ , όπως και στην απόδοση έτσι κι εδώ φανερώνει την πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου. Επαλήθευεται και η καλή αξιοπιστία η οποία φαίνεται από τις τιμές των “Adjusted  $R^2$ ” και “Predicted  $R^2$ ” που δεν έχουν υψηλή διαφορά (<0.2) και βρίσκονται σε λογική συμφωνία.

Η εξίσωση που προκύπτει είναι η παρακάτω:

$$TCC = 0.566667 - 0.002467 * P - 0.017917 * T + 0.000142 * T * P \quad (14)$$

Στη συνέχεια ακολουθεί το διάγραμμα προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών. Παρατηρείται ξανά ότι το κεντρικό σημείο απέχει σε μεγάλο βαθμό από το αντίστοιχο προβλεπόμενο του μοντέλου.



Διάγραμμα 18. Διάγραμμα προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών για τα καρτενοειδή



## Χλωροφύλλες

Για τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών, επιλέχθηκε το μοντέλο της ρίζας. Η πίεση, η θερμοκρασία, η ροή, το γινόμενο πίεσης – ροής και το γινόμενο θερμοκρασίας – ροής τέθηκαν σαν παράμετροι. Ακολουθεί ο πίνακας της στατιστικής ανάλυσης του μοντέλου:

Πίνακας 14. Στατιστική ανάλυση για το μοντέλο των χλωροφυλλών

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
<b>Model</b>	3.88	5	0.7751	165.79	< 0.0001
A-Pressure	3.62	1	3.62	774.88	< 0.0001
B-Temperature	0.0279	1	0.0279	5.96	0.0586
C-Feed	0.0027	1	0.0027	0.5801	0.4806
AC	0.1008	1	0.1008	21.56	0.0056
BC	0.1216	1	0.1216	26.00	0.0038
Curvature	0.3756	1	0.3756	80.34	0.0003
Lack of Fit	0.0127	2	0.0064	1.79	0.3080

Πίνακας 15. Συντελεστές προσαρμογής για το μοντέλο των χλωροφυλλών

<b>R<sup>2</sup></b>	0.9940
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.9880
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0.9430

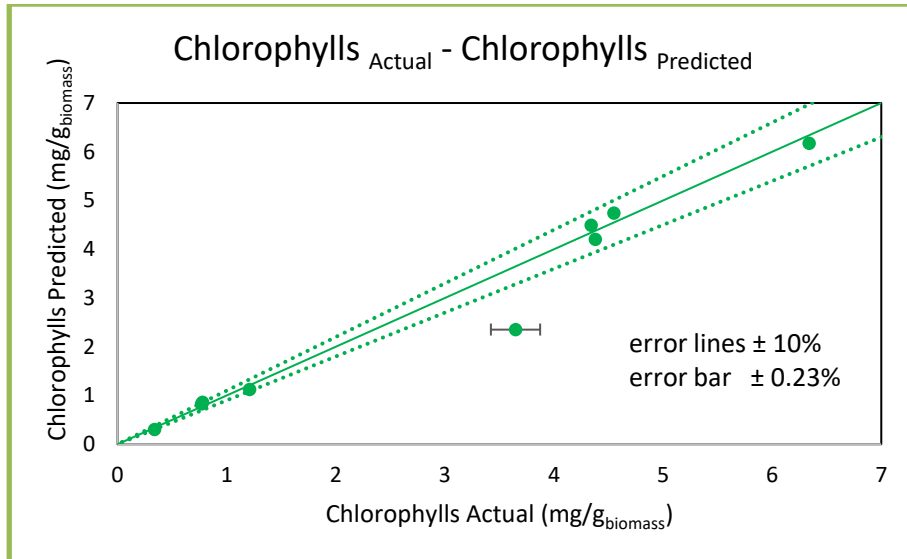
Μέσω του πίνακα 16, φαίνεται η σημαντικότητα του μοντέλου λόγω της υψηλής τιμής του  $F = 165.79$ . Επιπροσθέτως, η πίεση, η ροή και τα γινόμενα πίεσης – ροής και θερμοκρασίας – ροής είναι σημαντικές αφού  $p < 0.05$ . Τέλος με  $LOF = 1.79$ , εξάγεται το συμπέρασμα της καλής προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

Στο κομμάτι της προσαρμογής (Πίνακας 17), οι υψηλές τιμές του  $R^2$  και του «Adjusted  $R^2$ », καθώς και η μικρή διαφορά του δεύτερου από το «Predicted  $R^2$ », δηλώνουν επίσης την εξαιρετική προσαρμογή του μοντέλου.

Η εξίσωση που προκύπτει είναι η παρακάτω:

$$\begin{aligned} SQRT(Chlorophylls) \\ = -2.42340 + 0.012464 * P + 0.034662 * T + 1.19549 * F - 0.001995 \\ * P * F - 0.016435 * T * F \quad (15) \end{aligned}$$

Η γραφική απεικόνιση των προβλεπόμενων σε σχέση με τα πειραματικά σημεία δείχνει ότι έχουν μεγάλη συγγένεια εκτός από το κεντρικό σημείο το οποίο και σε αυτό το μοντέλο έχει μεγάλες αποκλίσεις.



Διάγραμμα 19. Διάγραμμα προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών για τις χλωροφύλλες

## Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η Υ.Ε του μακροφύκου *Ulva* και πιο συγκεκριμένα η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας και της ροής του CO<sub>2</sub> στην απόδοση, τον παράγοντα αντιοξειδωτικής δράσης IC<sub>50</sub>, και στις συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων των καρτενοειδών και των χλωροφυλλών.

Μέσα από τα πειράματα που διενεργήθηκαν, παρατηρείται ότι η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας παίζουν πρωταρχικό ρόλο. Η ροή του CO<sub>2</sub>, στα επίπεδα που μελετήθηκαν, έχει μικρή επίδραση στα αποτελέσματα της εκχύλισης.

Ειδικότερα, η αύξηση της πίεσης επιφέρει αύξηση της απόδοσης, μείωση του IC<sub>50</sub> και άρα αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης, αύξηση των φαινολικών ενώσεων και των συγκεντρώσεων καρτενοειδών και χλωροφυλλών. Αυτό συμβαίνει διότι, σε υψηλές πιέσεις το υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> έχει μεγαλύτερη πυκνότητα και άρα μεγαλύτερη διαλυτική ικανότητα. Η αύξηση της θερμοκρασίας έδειξε ότι κάποιες φορές μπορεί να επιδράσει θετικά στην απόδοση της ΥΕ και την ποιότητα του εκχυλίσματος και άλλες όχι. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμοκρασία επηρεάζει δύο αντικρουόμενους για τη διαλυτότητα παράγοντες, την πυκνότητα του διαλύτη (μείωση με αύξηση της θερμοκρασίας) και την τάση ατμών της προς διάλυση ουσίας (αύξηση της τάσης ατμών της με αύξηση της θερμοκρασίας). Επομένως, ανάλογα με το ποιος παράγοντας επικρατεί παρατηρείται διαφορετική επίδραση της θερμοκρασίας (crossover phenomena). Γενικά όμως, οι έντονες συνθήκες λειτουργίας, δηλαδή υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες, επιδρούν θετικά στην απόδοση αλλά και στην δραστηριότητα του εκχυλίσματος. Τέλος, με βάση τα πειραματικά δεδομένα, οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ήταν αυτές των 250 bar, 60°C και 1 kg CO<sub>2</sub> / h.

Με την προσθήκη αιθανόλης ως συν – διαλύτη, παρατηρήθηκαν πολύ καλύτερα αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται στην πολικότητα της αιθανόλης, με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται πολικές βιοδραστικές ουσίες. Ωστόσο, όσο και αν τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα με την χρήση αιθανόλης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την απομάκρυνση της αιθανόλης χρησιμοποιείται η διαδικασία της εξάτμισης, πράγμα που σημαίνει και οικονομική και ενεργειακή επιβάρυνση σε σχέση με το καθαρό υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>.

Όσον αφορά στη συμβατική εκχύλιση, συμπεραίνεται ότι οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος που έγινε δεν είναι οι βέλτιστες. Παρόλαυτα οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση αλλά σε όχι τόσο δραστικό εκχύλισμα. Προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση της διεργασίας ώστε να πραγματοποιηθεί μια σωστή σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης και να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα.

Αναφορικά με τη μοντελοποίηση και την στατιστική ανάλυση, ικανοποιητικά μοντέλα συσχέτισης με τις λειτουργικές παραμέτρους αναπτύχθηκαν για την απόδοση, τις συγκεντρώσεις των καρτενοειδών και των χλωροφυλλών. Και τα τρία μοντέλα, παρουσίασαν καλούς συντελεστές προσαρμογής R<sup>2</sup>, με τις χλωροφύλλες να εμφανίζουν την καλύτερη προσαρμογή. Όσο αφορά στο κεντρικό πειραματικό σημείο, αυτό παρουσίασε και στις τρεις περιπτώσεις σημαντική απόκλιση. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης των φαινολικών και του συντελεστή αντιοξειδωτικής δράσης IC<sub>50</sub>, δεν επιτεύχθηκε ανάπτυξη

αξιόπιστων μοντέλων, καθώς οι συντελεστές προσαρμογής ήταν μικροί και τα σφάλματα πολύ σημαντικά (μεγάλες τιμές LOF).

Συμπερασματικά, η Υπερκρίσιμη εκχύλιση αποτελεί μια καλή εναλλακτική των συμβατικών εκχυλίσεων για την εκχύλιση μακροαλγών, ιδιαίτερα με την χρήση συν – διαλύτη, καθώς είναι μια πράσινη μέθοδος, η οποία προσφέρει ικανοποιητικές αποδόσεις και εκχύλιση δραστικών εκχυλισμάτων, λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και δεν αφήνει μεγάλα περιβαλλοντικά αποτυπώματα.

## Προτάσεις για το μέλλον

Η Υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος η οποία απασχολεί και θα απασχολήσει ακόμα περισσότερο τα επόμενα χρόνια την επιστημονική κοινότητα. Επίσης τα μακροάλη και τα μικροάλη είναι και αυτές πρώτες ύλες οι οποίες έχουν υψηλές προοπτικές για μελλοντικές χρήσεις σε πολλούς τομείς. Είναι σημαντικό λοιπόν να πραγματοποιηθούν παραπάνω έρευνες πάνω στην εκχύλιση μακροαλγών με χρήση της Υ.Ε. Συγκεκριμένα, μια ωραία ιδέα είναι να γίνει έρευνα για την εκχύλιση και απομόνωση και άλλων ουσιών, όπως είναι τα λιπίδια και τα έλαια και να ερευνηθεί το ενδεχόμενο κατά πόσο είναι ικανή η πρώτη ύλη να χρησιμοποιηθεί στον τομέα των βιοκαυσίμων, ώστε να μειωθούν οι τοξικές ουσίες. Ακόμα είναι δυνατή η εκχύλιση συγκεκριμένων ουσιών οι οποίες ανιχνεύονται με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) όπως είναι η Φουκοξανθίνη. Επιπλέον, μπορούν να γίνουν χρήσεις και άλλων διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον όπως είναι το νερό. Τέλος, μπορεί να γίνει και έρευνα για την επίδραση της κοκκομετρίας στην ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών.

## Βιβλιογραφία

1. Pal, A., Kamthania, M. and Kumar, A., *Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review*. Open Access Library Journal, 2014. **1**: p. 1-17.
2. Dominguez, H. and E.P. Loret, *Ulva lactuca, A Source of Troubles and Potential Riches*. Marine Drugs, 2019. **17**(6): p. 357.
3. <https://www.ways2gogreenblog.com/2017/10/31/5-ways-seaweeds-are-present-in-your-daily-life/>. 20/5/23].
4. Kumar, M.S. and S.A. Sharma, *Toxicological effects of marine seaweeds: a cautious insight for human consumption*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021. **61**(3): p. 500-521.
5. Leandro, A., L. Pereira, and A.M. Gonçalves, *Diverse applications of marine macroalgae*. Marine drugs, 2019. **18**(1): p. 17.
6. <https://reefs.com/magazine/a-look-at-the-macroalgae-caulerpa/>. 9/6/2023].
7. <https://www.queenslandcountrylife.com.au/story/7182181/red-seaweed-rings-alarm-bell/>. 9/6/2023].
8. <https://en.wikipedia.org/wiki/Seaweed>. 9/6/2023].
9. <https://www.selleckchem.com/products/eicosapentaenoic-acid.html>. 1/6/2023].
10. <https://en.wikipedia.org/wiki/Sterol>. 1/6/2023].
11. <https://www.news-medical.net/news/20230329/Green-macroalgae-Ulva-Future-superfood.aspx>. 9/6/2023].
12. Cindana Mo' o, F.R., et al., *Ulvan, a Polysaccharide from Macroalga Ulva sp.: A Review of Chemistry, Biological Activities and Potential for Food and Biomedical Applications*. Applied Sciences, 2020. **10**(16): p. 5488.
13. Bikker, P., et al., *Biorefinery of the green seaweed Ulva lactuca to produce animal feed, chemicals and biofuels*. Journal of Applied Phycology, 2016. **28**(6): p. 3511-3525.
14. Lahaye, M. and A. Robic, *Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds*. Biomacromolecules, 2007. **8**(6): p. 1765-1774.
15. Yu-Qing, T., et al., *Ulva lactuca and its polysaccharides: Food and biomedical aspects*. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2016. **6**(1): p. 140-151.
16. Sirakaya, S., *Pros and cons of Ulva lactuca and Cladophora glomerata grown in freshwater as feed*. Environmental Science and Pollution Research, 2023. **30**(12): p. 33446-33454.
17. Costa, M., et al., *Current knowledge and future perspectives of the use of seaweeds for livestock production and meat quality: a systematic review*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2021. **105**(6): p. 1075-1102.
18. Michalak, I. and K. Chojnacka, *Algal extracts: Technology and advances*. Engineering in Life Sciences, 2014. **14**(6): p. 581-591.
19. Kadam, S.U., B.K. Tiwari, and C.P. O'Donnell, *Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(20): p. 4667-4675.
20. Luque de Castro, M.D. and F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2383-2389.
21. Mosca, F., et al., *Continuous or Batch Solid-Liquid Extraction of Antioxidant Compounds from Seeds of Sterculia apetala Plant and Kinetic Release Study*. Molecules, 2018. **23**(7): p. 1759.
22. Picot-Allain, C., et al., *Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective*. Current Opinion in Food Science, 2021. **40**: p. 144-156.
23. Knez, Ž., et al., *Industrial applications of supercritical fluids: A review*. Energy, 2014. **77**: p. 235-243.
24. Rabinarayan, P. and S. Padilama, *Supercritical Fluid Technology: A Review*. Journal of Advanced Pharmaceutical Science And Technology, 2013. **1**(1): p. 13-36.

25. Sihvonen, M., et al., *Advances in supercritical carbon dioxide technologies*. Trends in Food Science & Technology, 1999. **10**(6): p. 217-222.
26. Παπαϊωάννου, Ά.Θ., *ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΝΟΜΟΙ - ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ*. Vol. ΤΟΜΟΣ 1. 2007, ΑΘΗΝΑ.
27. Knez, Ž., et al., *Are supercritical fluids solvents for the future?* Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2019. **141**: p. 107532.
28. Louli, V., *Development of the supercritical fluid extraction technique and applications in the recovery of natural products*. 2004, National Technical University of Athens: Athens.
29. Hawthorne, S.B., *Analytical-scale supercritical fluid extraction*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(11): p. 633A-642A.
30. Bernal, J.M., et al., *Supercritical synthesis of biodiesel*. Molecules, 2012. **17**(7): p. 8696-8719.
31. Herrero, M., et al., *Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2495-2511.
32. Reverchon, E. and I. De Marco, *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*. The Journal of Supercritical Fluids, 2006. **38**(2): p. 146-166.
33. King, J.W., *Modern Supercritical Fluid Technology for Food Applications*. Annual Review of Food Science and Technology, 2014. **5**(1): p. 215-238.
34. Ahmad, T., et al., *Supercritical fluid extraction: A review*. J. Biol. Chem. Chron, 2019. **5**(1): p. 114-122.
35. <http://www.supercriticalfluid.org/Applications.149.0.html>. 18/5/2023].
36. Zorić, M., et al., *Supercritical CO<sub>2</sub> extracts in cosmetic industry: Current status and future perspectives*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2022. **27**: p. 100688.
37. Kiran, E., P.G. Debenedetti, and C.J. Peters, *Supercritical fluids: fundamentals and applications*. Vol. 366. 2012: Springer Science & Business Media.
38. Campardelli, R., L. Baldino, and E. Reverchon, *Supercritical fluids applications in nanomedicine*. The Journal of Supercritical Fluids, 2015. **101**: p. 193-214.
39. Clifford, A.A. and J.R. Williams, *Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications*, in *Supercritical Fluid Methods and Protocols*, J.R. Williams and A.A. Clifford, Editors. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-16.
40. Machado, B.A.S., et al., *Supercritical Fluid Extraction Using CO<sub>2</sub>: Main Applications and Future Perspectives*. Separation Science and Technology, 2013. **48**(18): p. 2741-2760.
41. Sen, S. and R. Chakraborty, *The Role of Antioxidants in Human Health*, in *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. 2011, American Chemical Society. p. 1-37.
42. Janciauskiene, S., *The Beneficial Effects of Antioxidants in Health And Diseases*. Chronic Obstr Pulm Dis, 2020. **7**(3): p. 182-202.
43. Bag, A. and P.K. Ghorai, *Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC<sub>50</sub>)*. Molecular Informatics, 2016. **35**(5): p. 199-206.
44. <https://en.wikipedia.org/wiki/IC50>. 30/5/2023].
45. Sirivibulkovit, K., S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, *Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis*. Analytical Sciences, 2018. **34**(7): p. 795-800.
46. Machu, L., et al., *Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products*. Molecules, 2015. **20**(1): p. 1118-1133.
47. Khoddami, A., M. Wilkes, and T. Roberts, *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds*. Molecules (Basel, Switzerland), 2013. **18**: p. 2328-75.

48. Ainsworth, E.A. and K.M. Gillespie, *Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent*. Nature Protocols, 2007. **2**(4): p. 875-877.
49. Hosikian, A., et al., *Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects*. International Journal of Chemical Engineering, 2010. **2010**: p. 391632.
50. Eismann, A.I., et al., *Ulva spp. carotenoids: Responses to environmental conditions*. Algal research, 2020. **48**: p. 101916.
51. Berman, J., et al., *Nutritionally important carotenoids as consumer products*. Phytochemistry Reviews, 2015. **14**: p. 727-743.
52. Christaki, E., et al., *Functional properties of carotenoids originating from algae*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(1): p. 5-11.
53. <https://www.shutterstock.com/image-vector/lutein-xanthophyll-molecule-type-carotenoid-260nw-1744032395.jpg>. 9/6/2023].
54. [https://www.aua.gr/katsileros/wp-content/uploads/2020/05/experimental\\_designs\\_11.pdf](https://www.aua.gr/katsileros/wp-content/uploads/2020/05/experimental_designs_11.pdf) 20/5/23.
55. <https://slideplayer.gr/slide/2907861/> 20/5/23].
56. Papamichail, I., V. Louli, and K. Magoulas, *Supercritical fluid extraction of celery seed oil*. The Journal of Supercritical Fluids, 2000. **18**(3): p. 213-226.
57. Laina, K.M., et al., *Process Design for the Extraction of Bioactive Compounds from Several Mediterranean Medicinal Plants*. Chemical Engineering Transactions, 2021. **86**: p. 1327-1332.
58. Drosou, C., et al., *A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts*. Industrial Crops and Products, 2015. **75**: p. 141-149.
59. Jeffrey, S.W. and G.F. Humphrey, *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 1975. **167**(2): p. 191-194.
60. Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Wright, S.W. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Monographs on Oceanographic Methodology; UNESCO Publishing: Paris, France, 1997*.
61. Sapkale, G., et al., *Supercritical fluid extraction*. Int. J. Chem. Sci, 2010. **8**(2): p. 729-743.
62. Sarkar, S., K. Gayen, and T.K. Bhowmick, *Green extraction of biomolecules from algae using subcritical and supercritical fluids*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022.
63. Kavoura, D., et al., *Supercritical CO2 extraction of Salvia fruticosa*. The Journal of Supercritical Fluids, 2019. **146**: p. 159-164.
64. Georgiopoulou, I., et al., *Supercritical CO2 Extraction of High-Added Value Compounds from Chlorella vulgaris: Experimental Design, Modelling and Optimization*. Molecules, 2022. **27**(18): p. 5884.
65. Jokić, S., et al., *Effects of supercritical CO2 extraction parameters on soybean oil yield*. Food and bioproducts processing, 2012. **90**(4): p. 693-699.
66. de Melo, M.M.R., et al., *Supercritical CO2 extraction of Aurantiochytrium sp. biomass for the enhanced recovery of omega-3 fatty acids and phenolic compounds*. Journal of CO2 Utilization, 2020. **38**: p. 24-31.
67. Hu, Q., et al., *Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of Chlorella pyrenoidosa extracts*. Journal of Food Engineering, 2007. **80**(4): p. 997-1001.
68. Perakis, C., V. Louli, and K. Magoulas, *Supercritical fluid extraction of black pepper oil*. Journal of Food Engineering, 2005. **71**(4): p. 386-393.



69. Solati, Z., B.S. Baharin, and H. Bagheri, *Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of Nigella sativa L. oil using full factorial design*. Industrial Crops and Products, 2012. **36**(1): p. 519-523.
70. Duba, K.S. and L. Fiori, *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics*. The Journal of Supercritical Fluids, 2015. **98**: p. 33-43.
71. Milovanovic, S., et al., *Green manufacturing of high-value extracts from milk thistle seeds: Parameters that affect the supercritical CO<sub>2</sub> extraction process*. Journal of CO<sub>2</sub> Utilization, 2022. **63**: p. 102134.
72. Shipeng, Y., et al., *Measurement of antioxidant activities and phenolic and flavonoid contents of the brown seaweed Sargassum horneri: comparison of supercritical CO<sub>2</sub> and various solvent extractions*. Fisheries and Aquatic Sciences, 2015. **18**(2): p. 123-130.
73. Ktari, L., et al., *Fucoxanthin and Phenolic Contents of Six Dictyotales From the Tunisian Coasts With an Emphasis for a Green Extraction Using a Supercritical CO<sub>2</sub> Method*. Frontiers in Marine Science, 2021. **8**.
74. Fabrowska, J., et al., *Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae*. Algal Research, 2016. **19**: p. 237-245.
75. Roberto, M., et al., *Supercritical Fluid Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds From Natural Sources – Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds)*. 2011. **5**.
76. Parjokolaei, B.R., et al., *Supercritical fluid extraction of carotenoids from Ulva lactuca (Chlorophyta)*. Planta Med., 2014. **80**(16): p. P1N26.
77. Macías-Sánchez, M.D., et al., *Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent*. Journal of separation science, 2008. **31**(8): p. 1352-1362.
78. Macías-Sánchez, M.D., et al., *Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from Synechococcus sp.* The Journal of Supercritical Fluids, 2007. **39**(3): p. 323-329.
79. Radzali, S.A., M. Markom, and N. Md Saleh, *Parameter Effects and Optimisation in Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds from Labisia pumila*. Separations, 2022. **9**(12): p. 385.
80. Ospina, M., H.I. Castro-Vargas, and F. Parada-Alfonso, *Antioxidant capacity of Colombian seaweeds: 1. Extracts obtained from Gracilaria mammillaris by means of supercritical fluid extraction*. The Journal of Supercritical Fluids, 2017. **128**: p. 314-322.
81. Pappou, S., et al., *Extraction of Bioactive Compounds from Ulva lactuca*. Applied Sciences, 2022. **12**(4): p. 2117.