

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΡΤΟΠΟΙΙΑΣ

Μ. Καφύρα^{1*}, Σ. Παπαδάκη¹, Μ. Κροκίδα¹

¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

(*mkafyra@gmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η εκχύλιση λιπαρών και πρωτεϊνών από τα μικροφύκη και συγκεκριμένα από την *Chlorella vulgaris*, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη αρτοσκευασμάτων με υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών και των πρωτεϊνών.

Στα προϊόντα αρτοποιίας περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες ουσίες που έχουν κατηγορηθεί για την ενίσχυση προβλημάτων υγείας όπως οι αλλεργίες, ο διαβήτης τύπου II αλλά και η, παχυσαρκία. Τέτοιες ουσίες είναι το βούτυρο, το αυγό αλλά και το φοινικέλαιο που αποτελούν κύρια συστατικά των αρτοσκευασμάτων και ιδιαίτερα των brioche, τα οποία μελετήθηκαν διεξοδικά στην παρούσα εργασία.

Με στόχο την καταπολέμηση όλων των ασθενειών που προκαλούνται ή ενισχύονται από αυτές τις τροφές τα ζωικά λιπαρά και οι πρωτεΐνες (δηλαδή το βούτυρο και το αυγό) υποκαταστάθηκαν από έλαιο Χλωρέλλας και ξηρή βιομάζα πρωτεϊνών Χλωρέλλας στη συνταγή. Οι υποκαταστάσεις αυτές δεν ελαχιστοποιούν μόνο τις αρνητικές συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία, αλλά προσφέρουν πολλαπλά οφέλη όπως είναι η αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε αρχικά η διαδικασία της εκχύλισης λιπαρών, χρησιμοποιώντας διαφορετικά συστήματα διαλυτών και συνθήκες διεργασίας. Το έλαιο που παραλήφθηκε, αποχρωματίστηκε και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αρτοσκευασμάτων τύπου brioche με 30%, 50% και 100% υποκατάσταση στα ζωικά λιπαρά, με την πλήρη υποκατάσταση να κρίνεται επιτυχής. Αντίστοιχα μελετήθηκε και η διαδικασία της εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους ώστε να αποσαφηνιστεί η αποδοτικότερη. Το υγρό εκχύλισμα πρωτεΐνης που παραλήφθηκε υπέστη την διαδικασία της λυοφιλίωσης προκειμένου να παραληφθεί το ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Μετά το πέρας της διαδικασίας κατέστη εφικτό το ξηρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα να έχει περιεκτικότητα 100% σε πρωτεΐνη. Το ξηρό εκχύλισμα πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να αναπτυχθούν brioche με υποκατάσταση ζωικών πρωτεϊνών σε ποσοστό 10%, 30%, 70% και 100%. Η πλήρης υποκατάσταση των ζωικών πρωτεϊνών (δηλαδή του αυγού) κατέστη εφικτή και σε τελευταίο στάδιο ελέγχθηκε η ανοχή του τελικού προϊόντος στην πλήρη υποκατάσταση (100%) τόσο των ζωικών λιπαρών όσο και πρωτεϊνών ταυτόχρονα, αναπτύσσοντας καινοτόμα brioche, τα οποία μετρήθηκαν και συγκρίθηκαν με την τυπική συνταγή ως προς τα φυσικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Η καινοτόμα συνταγή με την πλήρη υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών, κρίθηκε εφάμιλλη με την τυπική συνταγή, ενώ υπερίσχυσε σημαντικά σε χαρακτηριστικά όπως η αφράτη δομή, η αίσθηση φρεσκάδας και η έλλειψη ταγγύτητας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χλωρέλλα καλλιεργείται φυσικά στην Ταιβάν και στην Ιαπωνία, είναι πλούσια σε αμινοξέα, σε χλωροφύλλη, σε β-καροτένιο, σε βιταμίνες, αλλά και σε μέταλλα, μονοακόρεστα λιπαρά και πρωτεΐνες όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια. Εξαιτίας της σύστασης της, η χλωρέλλα έχει ευεργετικές συνέπειες στον ανθρώπινο οργανισμό, συντελώντας στην εύρυθμη λειτουργία του. Πιο συγκεκριμένα, βοηθά στην σωστή έκκριση των ορμονών, προωθεί την καλή καρδιαγγειακή υγεία, μειώνει τις κακές επιπτώσεις των χημειοθεραπειών, ενώ παράλληλα ρίχνει την αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα χοληστερόλης στον οργανισμό και αποτοξινώνει το σώμα¹⁻⁴.

Αναλυτικότερα η σύσταση της Χλωρέλλας, μπορεί να χαρακτηριστεί ως 5% περίπου υγρασία, 6%

τέφρα και 10% υδατάνθρακες. Επιπλέον περιέχει 48% πρωτεΐνες, ενώ τα ολικά λιπαρά της ανέρχονται σε ποσοστό 14%. Επίσης περιέχει σε ποσοστό περίπου 6% μέταλλα όπως ο φώσφορος, το κάλιο, το νάτριο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο σίδηρος. Το πλεονέκτημα της Χλωρέλλας ωστόσο, εξαιτίας του οποίου υπερτερεί έναντι άλλων υποκαταστατών ζωικών λιπαρών, δεν είναι μόνο η περιεκτικότητά της σε λιπαρά αλλά και του είδους των λιπαρών που περιέχονται, καθώς πρόκειται για ακόρεστα λιπαρά οξέα (δηλαδή λιπαρά οξέα που περιέχουν στην αλκυφατική τους αλυσίδα διπλούς ή και παραπάνω δεσμούς) και έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν ευεργετικές συνέπειες στον ανθρώπινο οργανισμό όπως αυτές που προαναφέρθηκαν. Το 34% των λιπαρών της Χλωρέλλας ανήκει στο ελαϊκό οξύ, ένα μονοακόρεστο ω-9 λιπαρό οξύ, ενώ το 12% των λιπαρών της είναι λινελαϊκό οξύ, το οποίο χαρακτηρίζεται ως ένα από τα σημαντικότερα ω-6 λιπαρά οξέα. Τέλος περιέχεται επίσης σημαντική ποσότητα λινολενικού οξέους, που αποτελεί πρόδρομο του εικοσιπεντανοϊκού (EPA) και του του δεκαεξανοϊκού οξέος (DHA) ⁵.

Σε ό,τι αφορά την διαδικασία της εκχύλισης των λιπαρών της Χλωρέλλας, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα λιπαρά οξέα που περιέχονται, αποτελούνται από δύο μέρη, ένα υδρόφιλο καρβοξυλικό και ένα υδρόφοβο υδρογονανθρακικό μέρος. Προκειμένου να εκχυλιστούν τα λιπαρά, είναι καλό να έχουν αλεστεί και ξηραθεί προκειμένου να μην υπάρχει νερό στο δείγμα, το οποίο δυσκολεύει την μεταφορά μάζας κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Στην συνέχεια είναι καλό το δείγμα να υποστεί μία μέθοδο διάρρηξης της κυτταρικής δομής προκειμένου τα ενδοκυτταρικά λιπίδια να διαλυθούν στο μέσο διάλυσης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των λιπαρών. Κατά την διάρκεια της εκχύλισης χρησιμοποιείται είτε κάποιος οργανικός διαλύτης είτε κάποιο υπερκρίσιμο ρευστό. Μετά την εκχύλιση στο προκύπτον μείγμα περιλαμβάνονται ο διαλύτης, τα λιπίδια σε υγρή μορφή και τα διερρηγμένα κύτταρα σε στερεή μορφή. Προκειμένου να διαχωριστούν αυτά τα συστατικά λαμβάνει χώρα ένας διαχωρισμός υγρού- στερεού όπως το φιλτράρισμα και στην συνέχεια ένας διαχωρισμός υγρού- υγρού όπως η απόσταξη, η εξάτμιση υπό κενό ή η προσρόφηση, προκειμένου να διαχωριστεί ο διαλύτης από το εκχύλισμα. Στην περίπτωση της υπερκρίσιμης εκχύλισης εξαιτίας της αποσυμπίεσης που λαμβάνει χώρα στο τέλος της διεργασίας ο διαλύτης επανέρχεται στην αρχική αέρια φάση του και τα λιπίδια αναγκάζονται να κατακρημνιστούν με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητο κάποιο επόμενο στάδιο για τον διαχωρισμό τους ⁶.

Σε ό,τι αφορά την εκχύλιση των πρωτεϊνών, προκειμένου να εκχυλιστεί όσο γίνεται μεγαλύτερο ποσοστό αυτών, είναι αναγκαίο να προηγηθεί μία μέθοδος διάρρηξης των κυττάρων. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η χρήση μικροκυμάτων ή υπερήχων, η άλεση και ομογενοποίηση των κυττάρων και η ενζυματική κατεργασία. Προκειμένου να διαφανεί ποια είναι η καταλληλότερη προ- κατεργασία είναι χρήσιμο να ερευνηθεί το είδος των πρωτεϊνών που περιέχει κάθε κύτταρο καθώς και η δομή του. Τα κύτταρα της χλωρέλλας περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα της χλωρέλλας υπάρχει το κυτταρόπλασμα, στο οποίο βρίσκονται υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, όπως επίσης και στον χλωροπλάστη. Ως μέσο εκχύλισης χρησιμοποιείται το νερό και το pH ρυθμίζεται κατάλληλα σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ⁷.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εκχύλιση Λιπαρών

Κάθε 1 g ξηρής χλωρέλλας διαλύεται σε 50 ml του συστήματος διαλύτη εξάνιο:ισοπροπανόλη (2:3) και εφαρμόζονται υπέρηχοι με τις ακόλουθες συνθήκες: $F=25$ kHz, $P= 400$ Watt, $T=45^{\circ}\text{C}$ και $t=10$ min. Στην συνέχεια, το μίγμα αναδεύεται για 8 ώρες σε μαγνητικό αναδευτήρα και φυγοκεντρείται με 2550 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη προκειμένου να υποστεί την περαιτέρω επεξεργασία και συγκεκριμένα αυτή της εξάτμισης του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστήρα και του αποχρωματισμού, ενώ η χλωρέλλα που κατακάθεται συλλέγεται, προκειμένου να εκχυλιστούν οι πρωτεΐνες. Η απόδοση της εκχύλισης υπολογίζεται ως το ποσοστό του ξηρού βάρους του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε ως προς το ξηρό βάρος της αρχικής ποσότητας χλωρέλλας που χρησιμοποιήθηκε.

Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Σε 18 ml απιονισμένο νερό, διαλύεται 1 gr χλωρέλλας και προστίθενται σταγόνες διαλύματος 5% NaOH μέχρι το pH να πάρει την τιμή 11. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 30 min με ταυτόχρονα έλεγχο του pH ώστε σε περίπτωση μείωσης της τιμής του να διορθώνεται με την προσθήκη μερικών ακόμα σταγόνων από το διάλυμα του υδροξειδίου του νατρίου. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 min σε 2550 rpm και στο υπερκείμενο προστίθεται το άλας θειικό αμμώνιο μέχρι την συγκέντρωση κορεσμού του (74 g/100 ml). Η προσθήκη του άλατος γίνεται σταδιακά και το διάλυμα αναδεύεται για 3 h. Μετά τα πέρασ της τρίωρης ανάδευσης του μίγματος, αυτό αφήνεται στο ψυγείο για τουλάχιστον 8 ώρες. Εν συνεχεία, το μίγμα φυγοκεντρείται για 10min συλλέγεται με την βοήθεια πιπέτας το υπερκείμενο υγρό, το οποίο στην συνέχεια διηθείται.

Ανάπτυξη Αρτοσκευασμάτων

Μετά την εκχύλιση των λιπαρών και των πρωτεϊνών αναπτύσσονται ψωμάκια τύπου brioche σύμφωνα με κλασική συνταγή, όπως φαίνεται στο πίνακα 1.

Πίνακας 1. Τυπική συνταγή για την παραγωγή αρτοσκευασμάτων τύπου brioche

Συστατικά	Ποσοστό	Ποσότητα (g)
Αλεύρι	100%	600
Νερό	41,3%	248,60
Μαγιά Ξηρή	2%	12
Αλάτι	2%	12
Φοινικέλαιο	10%	60
Βούτυρο (82% λιπαρά)	10%	60
Ζάχαρη	14%	84
Φρέσκο αυγό πλήρες παστεριωμένο	15%	90
Προπιονικό Οξύ	0,30%	1,80
Άρωμα βανίλιας	0,30%	1,80

Όλα τα υλικά τοποθετήθηκαν από την αρχή στον κάδο ζυμώματος του μίξερ εκτός από την μαγιά και το προπιονικό οξύ. Η ξηρή μαγιά διαλύθηκε πρώτα μόνη της σε χλιαρό νερό (περίπου 30°C) και

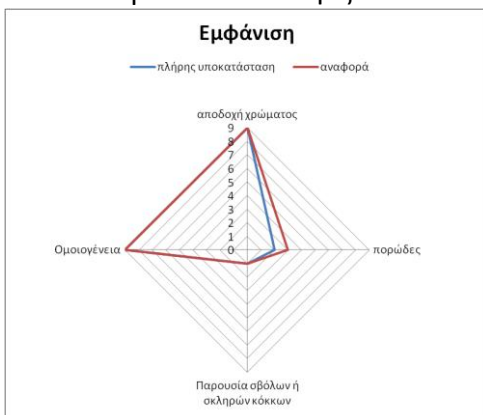
σε λίγη ζάχαρη και στη συνέχεια ανακατεύθηκε μαζί με τα υπόλοιπα υλικά. Αντίστοιχα το προπιονικό οξύ διαλύθηκε πρώτα σε νερό και στην συνέχεια προστέθηκε στο μίγμα των υλικών. Το μίγμα ζυμώθηκε για 10 min και στην συνέχεια χωρίστηκε σε κομμάτια των 74 g. Το κάθε κομμάτι ζύμης πλάστηκε σε μπαλάκια και στην συνέχεια σε μακρόστενα briocheτα οποία τοποθετήθηκαν σε λαμαρίνα ίδιου σχήματος. Τα brioche αφέθηκαν στον φούρνο για 2 ώρες στους 45°C προκειμένου να φουσκώσουν και να αποκτήσουν τον επιθυμητό όγκο, ενώ στην συνέχεια ψήθηκαν σε φούρνο για 10 min στους 200°C.

Οργανοληπτικός Έλεγχος

Πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος ανάμεσα στα brioche της τυπικής συνταγής και σε αυτά με 100% υποκατάσταση ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών από μία ομάδα 20 ατόμων. Η επιλογή των κριτών έγινε ανάμεσα από υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδάκτορες της σχολής χημικών μηχανικών, οι οποίοι ενημερώθηκαν λεπτομερώς για την διαδικασία, μέσα από μία μικρή διάλεξη που αφορούσε την μεθοδολογία του οργανοληπτικού ελέγχου και την διαδικασία της δοκιμής, σύμφωνα με το ISO 22935-1:2009 (IDF 99-1:2009)-General guidance for the recruitment, selection, training and monitoring of assessors. Οι κριτές αρχικά εξοικειώθηκαν με τα χαρακτηριστικά όλων των δειγμάτων, τα οποία προσφέρθηκαν για αξιολόγηση. Τα δείγματα προσφέρθηκαν σε διαφανή πλαστικά σακουλάκια αποθήκευσης τροφίμων, κωδικοποιημένα με τριψήφιους αριθμούς. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, αξιολογήθηκαν με βάση το πρότυπο ISO 22935-2:2009 (IDF 99-2:2009) και ISO 22935-3:2009 (IDF 99-3:2009). Ο δοκιμαστικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε είναι ένας έλεγχος που καταγράφει την γενική αποδοχή του προϊόντος αλλά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σε μία κλίμακα από το 1 έως το 9 όπου το 1 υποδεικνύει ότι η αποδοχή είναι πολύ μικρή, το 5 ουδέτερη και το 9 πολύ μεγάλη. Ο συνολικός βαθμός 5/9 θεωρήθηκε ως η μέση βαθμολογία για την ελάχιστη αποδοχή του προϊόντος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την μέθοδο εκχύλισης λιπαρών που χρησιμοποιήθηκε όπως αυτή προαναφέρθηκε, κατέστη εφικτή η εκχύλιση του 82% αυτών. Αντίστοιχα το 32% των πρωτεϊνών που περιέχονται στη χλωρέλλα παραλήφθηκε με τις προτεινόμενες μεθόδους. Τέλος σε ό,τι αφορά τον οργανοληπτικό έλεγχο, και συγκεκριμένα το χρώμα του τελικού προϊόντος, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δοκιμαστές δεν μπόρεσαν να ξεχωρίσουν την διαφορά των δύο συνταγών καθώς τα βαθμολόγησαν με τα ίδια νούμερα. Ως προς την εμφάνιση τα δύο προϊόντα κρίθηκαν όμοια καθώς σε όλα τα κριτήρια όπως η ομοιογένεια και η παρουσίαση σβόλων είχαν την ίδια μέση βαθμολογία. Μικρή διαφορά παρουσιάστηκε στο πορώδες που έκριναν οι δοκιμαστές πως είχε κάθε προϊόν, με τα αποτελέσματα να συνοψίζονται στο Σχήμα 1.



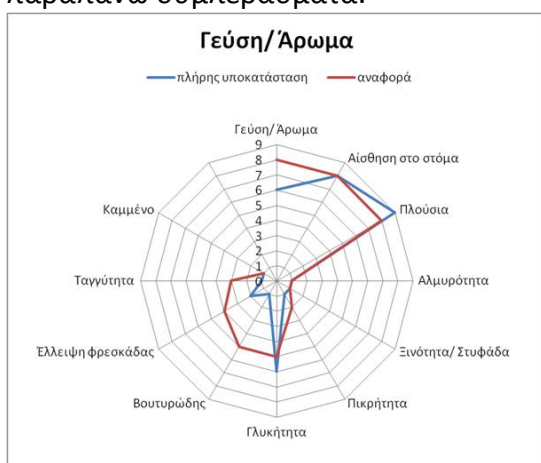
Σχήμα 1. Αραχνοειδές διάγραμμα για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου ως προς την εμφάνιση.

Αναφορικά με την μυρωδιά των δύο προϊόντων, το τυπικό προϊόν φάνηκε να έχει αρχικά ένα μικρό πλεονέκτημα όταν οι δοκιμαστές ήρθαν για πρώτη φορά σε επαφή με τα δύο δείγματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μυρωδιά που προσφέρει κυρίως το βούτυρο στο προϊόν, προσφέροντας του το γνωστό άρωμα των αρτοσκευασμάτων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 2

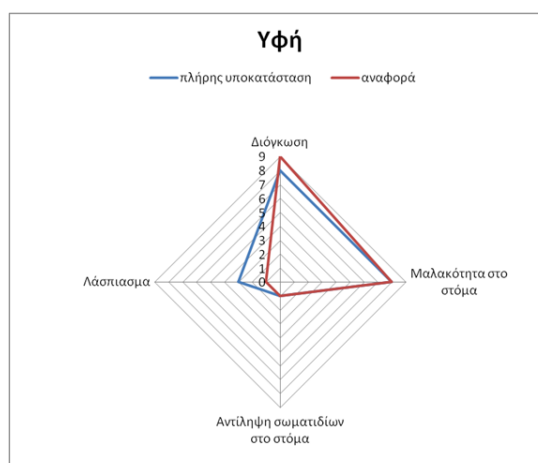
Πίνακας 2. Αποτελέσματα Οργανοληπτικού Ελέγχου ως προς την μυρωδιά

Κριτήρια	Αναφορά	Πλήρης Υποκατάσταση
Ένταση Μυρωδιάς	6	9
Αποδοχή Μυρωδιάς	9	9

Σε σχέση με τη γεύση/ το άρωμα των δύο συνταγών αρτοσκευασμάτων η πλήρης υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών, των πρωτεϊνών και του φοινικελαίου απέσπασε τις θετικές κριτικές των δοκιμαστών καθώς δεν είχε την ίδια ταγγύτητα και την έντονη γεύση βουτύρου που είχαν τα δείγματα αναφοράς ενώ φαινόταν περισσότερο φρέσκα και καλά διατηρημένα παρόλο που η παρασκευή τους είχε γίνει την ίδια χρονική στιγμή. Τέλος σε ό,τι αφορά την υφή φαίνεται πως τα αρτοσκευάσματα που παρασκευάστηκαν με πλήρη αντικατάσταση των λιπαρών και των πρωτεϊνών, είχαν πιο έντονη την αίσθηση του λασπώματος σε σχέση με αυτά που παρήχθησαν ακολουθώντας την τυπική συνταγή. Παρόλα αυτά βαθμολογήθηκαν με 3, νούμερο που χαρακτηρίζει το προϊόν αποδεκτό από τους δοκιμαστές. Τα σχήματα 2 και 3 απεικονίζουν τα παραπάνω συμπεράσματα.



Σχήμα 2. Αραχνοειδές διάγραμμα για την γεύση/ άρωμα



Σχήμα 2. Αραχνοειδές διάγραμμα για την υφή

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ποσοστό λιπαρών που παραλήφθηκε κρίνεται ικανοποιητικό, καθώς για την επίτευξη μεγαλύτερων αποδόσεων είναι υποχρεωτική η χρήση διαλυτών που δεν είναι σύμφωνοι με την ευρωπαϊκή νομοθεσία. Επιτυχής κρίθηκε επίσης και η εκχύλιση των πρωτεϊνών, η οποία σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές δεν μπορεί να υπερβεί το 52% για την Χλωρέλλα, χρησιμοποιώντας τεχνικές και χημικά ιδιαίτερα αποτελεσματικά αλλά απαγορευμένα από την νομοθεσία για χρήση σε προϊόντα που πρόκειται να καταναλωθούν από ανθρώπους, ενώ το ποσοστό εκχύλισης πέφτει στο 32% των περιεχόμενων πρωτεϊνών, όταν χρησιμοποιούνται αποκλειστικά χημικές ουσίες που επιτρέπονται να χρησιμοποιηθούν σε προϊόντα προς βρώση^{8,9}. Τέλος η βαθμολογία του καινοτόμου προϊόντος στον οργανοληπτικό έλεγχο, κρίνεται εφάμιλλη της

παραδοσιακής συνταγής με επιμέρους διαφοροποιήσεις να μην αλλοιώνουν την γενική υψηλή βαθμολογία στην αποδοχή του προϊόντος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kim Y, Kwon S. Effect of *Chlorella vulgaris* intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. *Nutr Res Pract.*3(2009) 89-94.
2. Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueirêdo CA V, Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol.*3(2003) 889-900.
3. Panahi Y, Mostafazadeh B, Abrishami A, et al. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers. *Clin Lab.* 59(2013):579-587.
4. Mizoguchi T, Takehara I, Masuzawa T, Saito T, Naoki Y. Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *J Med Food.*11(2008) 395-404.
5. Tokusoglu O, uunal MK. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *J Food Sci.*68(2003) 1144-1148.
6. Halim R, Danquah MK, Webley PA. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv.*30(2012) 709-732.
7. Barbarino E, Lourenço SO. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *J Appl Phycol.* 17 (2005)447-460.
8. Ghodsvali A, Khodaparast MHH, Vosoughi M, Diosady LL. Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Res Int.* 38(2005):223-231.
9. Schwenzfeier A, Wierenga PA, Gruppen H. *Bioresour Technol.* 102(2017) 19.