

Integration of pulsed electric fields technology in the biorefinery of agri-food wastes and microalgae

Daniele Carullo, Ph.D.
University of Salerno – Fisciano (Italy)

Abstract

Recently, the idea of valorizing industrial agro-food wastes and microalgal biomass, through an efficient recovery of their major bioactive constituents to be used as ingredients in food, feed, pharmaceutical and cosmetic sectors, is gaining interest, due to the increasing demand of consumers for natural products.

However, the extraction of these compounds is problematic, due to the presence of a “physical barrier” (cell wall/membrane) when removing intracellular substances. Pre-treatment stage (thermal, mechanical or enzymatic) to permeabilise cellular tissues and facilitate the diffusion of the intracellular compounds in the external medium are required, together with the use of large amount of organic solvents and long contact times. This lead to high energy consumption, the formation of undesired compounds as well as to the eventual degradation of the target molecules to be recovered. Physical pretreatments operations have been proposed in the last year to overcome these problems and among them Pulsed electric fields (PEF) technology has shown promising results as to obtain mild, sustainable and efficient permeabilisation of cell membranes with respect to conventional cell disintegration methods. PEF consists in exposing biological cells to repetitive short voltage pulses (μs – ms in width) with an electric field strength in the range 0.5 - 50 kV/cm and an energy input up to 150 kJ/kg, mainly depending on cell size and morphology. This technique exploits its potential via the “electroporation” of membranes, which rapidly favors the leakage of valuable compounds from the cells.

Although the use of PEF has shown encouraging results in the last years in enhancing mass transfer rates from vegetative biological tissues, there was a strong need to perform a systematic study which may consider not only the effect of the electroporation phase, but also the influence of upstream (granulometry, solid-liquid ratio) and downstream processes (extraction, purification) on the extraction yield and extract quality from treated biomass.

Therefore, the main aim of my PhD thesis was to propose a systematic approach for the development of a PEF-based biorefinery process for an efficient and sustainable valorization of agro-food wastes/by-products and microalgal biomass.

To this purpose, different food wastes (tomato skins, artichoke external bracts and stems) and microalgal strains (*A. platensis*, *C. vulgaris*) have been selected and subjected in the first instance to

a study of the “electroporation” mechanism of cell membranes, carried out in lab-scale or pilot-scale specifically designed treatment chambers, by using several analytical methods (in situ measurements of electrical impedance/conductivity, particle size distribution, optical and SEM microscopy), accompanied by the assessment of target intracellular components release (carotenoids, polyphenols, proteins, carbohydrates, lipids) after the application of PEF treatments of variable intensity.

Only in the case of microalgal biomass processing, in order to furtherly enhance the recovery yields of specific molecules from the cells, “hurdle approaches” have been proposed (PEF + mild heating, PEF + other disruptive technologies such as High Shear Homogenization or High Pressure Homogenization) and their effects compared with those achieved by the application of single treatments in terms of purity of extracts and energetic consumptions.

The results obtained highlighted the potentiality of PEF to unlock intracellular substances from the considered matrices in a “cell structure” dependent manner, with maximum effects detected at very low energy input (1 – 5 kJ/kg) for tomato skins and artichoke wastes, while microalgal cells required the application of higher treatment severities (100 kJ/kg) to achieve proper disintegration degrees, due to a greater rigidity of the cell wall/membrane system.

Moreover, microscopy observations have shown that PEF represents a mild disintegration technique, since no formation of cell debris could be detected, which may potentially allow to avoid excessive costs for further refining operations (e.g. solid/liquid separation, purification of extracts).

The permeabilisation effect achieved after PEF application has promoted, consequently, the selective and efficient release of intracellular compounds from both food wastes and microalgal biomass during extractions, with significantly higher recovery yields in carotenoids from tomato skins, phenolic acids from artichoke wastes, carbohydrates, lipids and proteins from microalgal biomass, solubilized extracting solvents (e.g. water, acetone, ethyl lactate, ethyl acetate) with low “environmental impact”, which could grant the possibility to exploit the use of exhaust biomass, if adequately processed, for further applications.

The use of PEF in combined approaches for microalgal biomass processing showed interesting results in terms of both purity and yields of extracts, with significant reduction of operative costs needed for cell permeabilisation and recovery of high-added value intracellular compounds, with respect to the application of single PEF technology.

In conclusions, the optimization of PEF-assisted cell permeabilisation of food wastes/microalgae represents only the first step towards a sustainable biorefinery processing, while further research is needed for a better understanding of the role of PEF technology on downstream processing operations, which still need to be optimized to possibly move towards industrial applications.

Integrazione della tecnologia PEF nella biorefinery di scarti alimentari e microalghe

Daniele Carullo, Ph.D.
Università degli Studi di Salerno – Fisciano (Italia)

Abstract

Negli ultimi anni, l'idea di valorizzare scarti dell'industria alimentare e biomassa microalgale attraverso un recupero efficiente dei loro principali composti bioattivi, di interesse per i settori alimentare, farmaceutico e cosmetico, sta prendendo sempre più piede, specialmente per la crescente domanda da parte dei consumatori di prodotti naturali. Comunque, l'estrazione di tali composti è problematica, a causa della presenza di una "barriera fisica" (sistema parete/membrana cellulare) che limita la rimozione delle sostanze intracellulari. Pertanto, sono richiesti dei pretrattamenti (termici, meccanici o enzimatici) allo scopo di permeabilizzare i tessuti cellulari e facilitare la diffusione dei composti intracellulari attraverso l'ambiente esterno, insieme con l'utilizzo di grandi quantità di solvente organico e lunghi tempi di contatto. Tali processi sono, tuttavia, associati a consumi energetici elevati e inoltre è possibile la formazione di composti indesiderati così come l'eventuale degradazione delle molecole di interesse. Di recente sono stati proposti diversi pretrattamenti di tipo fisico per ovviare alle problematiche sopra menzionate, tra cui la tecnologia PEF (campi elettrici pulsati) che ha mostrato risultati interessanti in termini di permeabilizzazione sostenibile ed efficiente delle membrane cellulari rispetto ai metodi di disintegrazione convenzionali. Tale tecnologia consiste nel sottoporre cellule biologiche a impulsi di campo elettrico di breve durata (μs – ms), variabile intensità nel range 0.5 - 50 kV/cm ed energia specifica fino a 150 kJ/kg, a seconda della morfologia e dimensione cellulare.

Il principio fisico su cui si basa l'applicazione dei PEF è denominato "elettroporazione", che favorisce velocemente il rilascio di composti ad alto valore aggiunto dalle cellule dei tessuti trattati. Nonostante tale tecnologia abbia mostrato risultati incoraggianti da un punto di vista del miglioramento di trasferimento di materia da tessuti biologici, vi è la necessità di condurre uno studio sistematico che possa considerare non solo l'effetto del processo di elettroporazione, ma anche l'influenza delle fasi di "upstream" (granulometria, rapporto solido/liquido) e "downstream" (estrazione, purificazione) sulle rese di recupero e sulla qualità degli estratti dalle matrici processate.

A tal proposito, lo scopo principale di questa tesi di dottorato è stato quello di proporre un approccio sistematico per lo sviluppo di processi di biorefinery assistiti da PEF per la valorizzazione sostenibile ed efficiente di scarti dell'industria alimentare e biomassa microalgale.

In particolare, sono stati selezionati differenti scarti alimentari (bucce di pomodoro, gambi e brattee esterne di carciofo) e ceppi microalgali (*A. platensis*, *C. vulgaris*), successivamente sottoposti in prima battuta ad uno studio approfondito del meccanismo di elettroporazione delle membrane cellulari, condotto utilizzando varie camere di trattamento su scala di laboratorio e pilota, mediante diverse procedure analitiche (misure dell'impedenza/conducibilità elettrica, distribuzione particellare, microscopia ottica e SEM), così come attraverso la valutazione del rilascio di composti intracellulari d'interesse (carotenoidi, polifenoli, proteine, carboidrati, lipidi), in seguito all'applicazione di trattamenti PEF ad intensità variabile. Soltanto nel caso della biomassa microalgale, allo scopo di migliorare ulteriormente le rese di estrazione di molecole specifiche dalle cellule sottoposte a processi di estrazione, sono stati proposti approcci "hurdle", combinando la tecnologia PEF con mezzi fisici o meccanici (PEF + temperatura, PEF + High Shear Homogenization o High Pressure Homogenization), e gli effetti comparati con quelli derivanti dall'applicazione dei trattamenti singoli in termini di purezza degli estratti e consumi energetici associati. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno mostrato l'efficacia della tecnologia PEF nel liberare sostanze intracellulari dalle matrici trattate in una modalità dipendente dalla struttura cellulare, con massimi effetti identificati a bassi consumi energetici (1 – 5 kJ/kg) per bucce di pomodoro e scarti di carciofo, mentre le cellule microalgali hanno richiesto una maggiore drasticità di trattamento PEF (100 kJ/kg) per raggiungere soddisfacenti gradi di disintegrazione cellulare, a causa di una maggiore rigidità del sistema parete/membrana.

Inoltre, dalle osservazioni microscopiche è emerso che la tecnologia PEF non porta alla formazione di debris cellulare, favorendo così una riduzione dei costi di processo per le successive fasi di raffinazione (separazione solido/liquido, purificazione degli estratti).

L'effetto di permeabilizzazione raggiunto in seguito all'applicazione della tecnologia PEF ha anche garantito un rilascio efficiente e selettivo dei composti intracellulari da entrambe le matrici investigate durante la fase di estrazione, con elevate rese di recupero di carotenoidi da bucce di pomodoro, acidi fenolici da scarti di carciofo, carboidrati, lipidi e proteine da biomassa microalgale, solubilizzati in solventi a basso impatto ambientale (acqua, acetone, lattato di etile, acetato di etile), che permettono un ulteriore utilizzo della biomassa esausta, se opportunamente processata. L'utilizzo della tecnologia PEF in approcci combinati per la valorizzazione di biomassa microalgale ha mostrato risultati notevoli in termini di purezza e resa degli estratti, con un abbassamento significativo dei costi operativi per condurre la fase di permeabilizzazione cellulare rispetto al singolo trattamento PEF.

In definitiva, l'ottimizzazione della permeabilizzazione cellulare mediante PEF di scarti alimentari e microalghe rappresenta solo il primo step verso il raggiungimento di un processo di biorefinery sostenibile, mentre ulteriori studi devono essere condotti per ampliare la conoscenza sul ruolo del PEF sulle fasi di downstream, allo scopo di muovere verso applicazioni industriali.