



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**Καινοτομία, Ασφάλεια και Ποιότητα Τροφίμων**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία**

**Τα μικροφύκη ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας**

Όνομα φοιτητή:

Κοντομήτρου Μαρία

Όνομα επιβλέπουσας καθηγήτριας:

Κρίτση Ευτυχία

Αιγάλεω, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
FACULTY OF FOOD SCIENCES  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND  
TECHNOLOGY

Master of Science

**Food Innovation, Quality and Safety**

**Msc Thesis**

**Microalgae as a source of high-value bioactive compounds**

Name of student:

Kontomitrou Maria

Name of supervisor:

Kritsi Eftichia

Aigaleo, 2024

### Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο 'Τα μικροφύκη ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας' που παρουσιάστηκε από την Μαρία Κοντομήτρου, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>A/α</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
01	ΕΥΤΥΧΙΑ ΚΡΙΤΣΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ / ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ	
02	ΕΙΡΗΝΗ ΣΤΡΑΤΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΜΕΛΟΣ	
03	ΘΑΛΕΙΑ ΤΣΙΑΚΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΜΕΛΟΣ	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κοντομήτρου Μαρία του Κωσταντίνου, με αριθμό μητρώου 22006 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα  
Κοντομήτρου Μαρία



## **Ευχαριστίες**

Οι σπουδές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «*Καινοτομία, Ασφάλεια και Ποιότητα Τροφίμων*» στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής ολοκληρώνεται με την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία και έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του προγράμματος καθώς και τους συμφοιτητές μου που συνέβαλαν στη διεύρυνση των γνώσεών μου αλλά και στην ανάπτυξη του αισθήματος συνεργασίας.

Ιδιαίτερα επιθυμώ να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Κρίτση Ευτυχία, η οποία με τις συμβουλές της, τις οδηγίες της και την άμεση ανταπόκρισή της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, μου έδωσε όλα τα απαραίτητα εφόδια να ολοκληρώσω τον κύκλο σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω βαθιά τους γονείς μου για την αμέριστη στήριξή τους σε όλη τη διαδρομή των σπουδών μου καθώς και τον σύντροφό μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειχνε καθημερινώς και ανελλιπώς.

## Περίληψη

Τα μικροφύκη είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί τεράστιας βιοποικιλότητας και αποτελούν μια από τις αρχαιότερες μορφές ζωής στον πλανήτη και πηγή τροφής για το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας βιομάζας. Έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν πληθώρα βιοδραστικών μεταβολιτών (όπως χρωστικές ενώσεις, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις), οι οποίοι όπως έχει αποδειχθεί επηρεάζουν θετικά διάφορες ασθένειες, παρουσιάζοντας ποικίλες δράσεις, όπως αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντική καθώς επίσης επιδρούν θετικά ανοσοποιητικό σύστημα. Λόγω της παρουσίας βιοδραστικών ενώσεων, τα μικροφύκη θεωρούνται δυνητική πηγή για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων και ουσίες τους έχουν ήδη ενσωματωθεί σε διάφορα προϊόντα τροφίμων και καλλυντικών. Διάφορες στρατηγικές και τεχνικές καλλιέργειας και απομόνωσης των βιοδραστικών ενώσεων μικροφυκών έχουν αναπτυχθεί τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο με στόχο τη βέλτιστη εμπορευματοποίησή τους σε διάφορους κλάδους, όπως η βιομηχανία τροφίμων, οι υδατοκαλλιέργειες και οι ζωοτροφές, η φαρμακευτική βιομηχανία και η κοσμητολογία. Ωστόσο, η χρήση μικροφυκών εκτός από πλεονεκτήματα παρουσιάζει και μειονεκτήματα που εξετάζονται συνεχώς από ερευνητές και επιστήμονες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση για τα μικροφύκη ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας που στοχεύουν στην ενίσχυση της υγείας του ανθρώπου, στους τρόπους βελτιστοποίησης των παραμέτρων καλλιέργειάς τους ώστε να ενισχυθεί η παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων και στους τρόπους εκχύλισης και απομόνωσης με συμβατικές αλλά και προηγμένες τεχνικές και μεθόδους. Επιπλέον, μελετήθηκε η εμπορική χρήση των ουσιών αυτών στις βιομηχανίες με αναφορά σε κανονιστικές υποθέσεις, ρυθμιστικά πλαίσια και θέματα ασφαλείας που αφορούν την εμπορευματοποίηση και την κατανάλωσή τους. Καθώς το πεδίο εμπορευματοποίησης των μικροφυκών βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, υπάρχουν ακόμα πολλά περιθώρια βελτίωσης και απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με τα οφέλη τους στην ανθρώπινη υγεία.

Λέξεις κλειδιά: μικροφύκη, βιοδραστικές ενώσεις, καλλιέργεια μικροφυκών, εκχύλιση μικροφυκών, βιοδραστικότητα μικροφυκών, εφαρμογές μικροφυκών.

## Abstract

Microalgae are photosynthetic microorganisms of enormous biodiversity and are one of the oldest life forms on the planet and the food source for most of the world's biomass. They have the ability to biosynthesise a multitude of bioactive metabolites (such as pigments, carbohydrates, proteins, lipids and fatty acids, phenolic compounds), which through studies have been shown to have a positive effect on various diseases and exhibit a variety of actions such as anti-cancer, antioxidant, antimicrobial, antiviral and immune system effects. Due to the presence of bioactive compounds, microalgae are considered a potential source for human and animal nutrition and their substances have already been incorporated into various food and cosmetic products. Various strategies and techniques for the cultivation and isolation of microalgal bioactive compounds have been developed both at research and industrial level with the aim of their optimal commercialisation in various sectors such as food industry, aquaculture and animal feed, pharmaceutical industry and cosmetology. However, the use of microalgae, besides advantages, also present disadvantages that are constantly being examined by researchers and scientists. In this thesis, an extensive review on microalgae as a source of high value-added bioactive compounds aimed at enhancing human health, ways to optimize their cultivation parameters to enhance the production of bioactive compounds and ways of extraction and isolation using both conventional and advanced techniques and methods will be carried out. In addition, the commercial use of these substances in industries is studied with reference to regulatory affairs, regulatory frameworks and safety issues related to their commercialisation and consumption. As the field of commercialisation of microalgae is still at an early stage, there is still much room for improvement and further research on their benefits to human health is needed.

Keywords: microalgae, bioactive compounds, microalgae culture, microalgae extraction, bioactivity of microalgae, microalgae applications.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>11</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ: ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ .....</b>	<b>16</b>
1.1. Επισκόπηση μικροφυκών .....	16
1.2. Ταξινόμηση μικροφυκών.....	20
1.2.1. Γαλάζια - πράσινα φύκη και προχλωρόφυτα .....	21
1.2.2. Γλαυκόφυτα .....	21
1.2.3. Κόκκινα φύκη .....	22
1.2.4. Κρυπτόφυτα .....	23
1.2.5. Πράσινα φύκη .....	23
1.2.6. Χλωραραχνιόφυτα .....	24
1.2.7. Ευγληνόφυτα .....	24
1.2.8. Χρωμόφυτα άλγη .....	24
1.2.9. Δινοφύκη.....	24
1.3. Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των μικροφυκών.....	27
1.4. Συστήματα καλλιέργειας .....	30
1.4.1. Συστήματα ανοικτών δεξαμενών.....	31
1.4.2. Κλειστά συστήματα: Φωτοβιοαντιδραστήρες.....	32
1.4.3. Υβριδικά συστήματα .....	35
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ .....</b>	<b>37</b>
2.1 Εισαγωγή .....	37
2.2. Χρωστικές ενώσεις.....	37
2.2.1. Χλωροφύλλες.....	38
2.2.2. β-καροτένιο.....	41
2.2.3 Ασταξανθίνη.....	43
2.2.4 Φυκοπρωτεΐνες .....	46
2.3. Υδατάνθρακες.....	47
2.4. Πρωτεΐνες .....	50
2.5. Λιπίδια .....	55
2.5.1. Λιπαρά οξέα.....	55
2.5.2 Κήροι .....	58



2.5.3. Τερπενοειδή .....	58
2.5.4. Γλυκερολιπίδια.....	58
2.5.5. Γλυκολιπίδια .....	59
2.5.6. Φωσφολιπίδια .....	59
2.6. Φαινολικές ενώσεις .....	59
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ .....</b>	<b>63</b>
3.1 Μέθοδοι εκχύλισης .....	63
3.1.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης (conventional extraction methods).....	63
3.1.2 Προηγμένες τεχνικές εκχύλισης (π.χ. μικροκύματα, εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού).....	69
3.2 Τεχνικές απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη .....	75
3.2.1. Φασματοφωτομετρία .....	75
3.2.2. Χρωματογραφικές Μέθοδοι .....	76
3.3 Σύγχρονες στρατηγικές για την εκχύλιση και απομόνωση .....	84
3.3.1. Μέθοδος οσμωτικής πίεσης .....	84
3.3.2. Ισοτονική Μέθοδος Εκχύλισης.....	85
3.3.3. Τεχνολογία υπερκρίσιμου υγρού CO <sub>2</sub> .....	85
3.3.4. Νέες προσεγγίσεις στις τεχνικές χρωματογραφίας .....	86
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ .....</b>	<b>88</b>
4.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης .....	88
4.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	99
4.2.1. Αντιβακτηριακές ιδιότητες.....	99
4.2.2. Αντιμυκητιασικές ιδιότητες .....	101
4.2.3. Αντικές ιδιότητες.....	104
4.3 Αντικαρκινική δράση .....	105
4.4 Επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα .....	108
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΕΜΠΟΡΕΥΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ.....</b>	<b>110</b>
5.1 Τα μικροφύκη στη βιομηχανία τροφίμων .....	110
5.1.1 Διατροφοδραστικά συστατικά (Nutraceuticals) .....	113
5.1.2 Λειτουργικά τρόφιμα (Functional foods) .....	116

5.2 Εφαρμογές στην Υδατοκαλλιέργεια και τις Ζωοτροφές.....	121
5.2.1 Ζωοτροφές .....	121
5.2.2 Υδατοκαλλιέργεια .....	123
5.3 Φαρμακευτικά προϊόντα και ανάπτυξη φαρμάκων .....	127
5.4 Καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής ομορφιάς.....	131
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΗΜΕΡΙΝΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ .....</b>	<b>134</b>
6.1 Τεχνολογικές προκλήσεις .....	134
6.2 Κανονιστικές υποθέσεις και θέματα ασφάλειας.....	136
6.3 Στρατηγικές βιωσιμότητας .....	140
6.4 Αναδυόμενες τάσεις και μελλοντικές ευκαιρίες έρευνας .....	142
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>146</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>147</b>

## Κατάλογος Πινάκων

**Πίνακας 1.4.1.:** Μια συγκεντρωτική παρουσίαση και σύγκριση των ιδιοτήτων των μεθόδων καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας (Brennan and Owende, 2010). **Πίνακας 2.2.1.:** Η επίδραση των συνθηκών φωτισμού στην κυτταρική περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη διαφόρων ειδών μικροφυκών (da Silva Ferreira, V. et al., 2017). **Πίνακας 2.3.1.:** Υδατάνθρακες σε επιλεγμένα είδη μικροφυκών (Markou G. et al., 2012). **Πίνακας 2.4.1.:** Προφίλ αμινοξέων διαφόρων πρωτεϊνών από μικροφύκη και πρωτεϊνών από διάφορες πηγές που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, εκτός από το πρότυπο που συνιστάται από τον FAO (g\*100 g<sup>-1</sup> πρωτεΐνης). **Πίνακας 3.1.1.:** Η απόδοση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που εξαγονται μέσω μηχανικής εκχύλισης (C.Salinas-Salazar et.al, 2019). **Πίνακας 3.1.2.:** Η απόδοση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που εξαγονται με ενζυματική εκχύλιση (C.Salinas-Salazar et.al, 2019). **Πίνακας 3.1.3.:** Κρίσιμες ιδιότητες των διαφόρων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις διεργασίες εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού (Molino A. et.al,2019). **Πίνακας 3.2.1.:** Περίληψη των διαφόρων τεχνικών και των αρχών που διέπουν τις διάφορες μεθόδους χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση συστατικών μικροφυκών (Kiani H et.al, 2022). **Πίνακας 3.2.2.:** Περίληψη των χρωματογραφικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση διαφόρων καρτενοειδών μικροφυκών (Kiani H. et al., 2022). **Πίνακας 3.2.3.:** Χρωματογραφία GC και οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε πρόσφατες μελέτες που περιλαμβάνουν ανάλυση ω-3 PUFA από μικροφύκη (Kiani H. et al., 2022). **Πίνακας 4.1.1.:** Αντιοξειδωτικές ενώσεις με αυξημένη παραγωγή από μικροφύκη υπό οξειδωτικό στρες (Gauthier, M. R. et al., 2020). **Πίνακας 4.2.1.:** Αντιβακτηριακή δράση από μικροφύκη έναντι ανθρώπινων παθογόνων βακτηρίων (Falaise, C. et al., 2016). **Πίνακας 4.2.2.:** Αντιμυκητιακή δράση από μικροφύκη (Falaise, C. et al., 2016). **Πίνακας 6.2.1.:** Χαρακτηρισμός ασφάλειας για χρήση μικροφυκών σε τρόφιμα από τον FDA (Enzing C et.al 2014).

## Κατάλογος Εικόνων

**Εικόνα 1.1.1.** Ενδεικτική αναπαράσταση της σύνθεσης υδατανθράκων στο κύτταρο μικροφυκών (CO<sub>2</sub>: διοξείδιο του άνθρακα, EPS: εξωπολυσακχαρίτης, G3P: φωσφορική γλυκεραλδεΐδη-3, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: διττανθρακικό, RuBP: ριβουλόζη-1,5-διφωσφορική, 3-PGA: φωσφογλυκερικό) (Moreira, J. B. et al., 2022).

**Εικόνα 1.1.2.:** 4 σημαντικές κλάσεις μικροφυκών, ο αριθμός των ειδών τους, και τα ενδιαίτητά τους (Khan SA et al., 2009)

**Εικόνα 1.1.3.:** Περιεκτικότητα σε έλαια διαφόρων στελεχών των μικροφυκών (Khan SA et al., 2009).

**Εικόνα 1.2.1:** Φυλογενετικό σχήμα για τις κατηγορίες των μικροφυκών (BioScience vol. 46, No.4.)

**Εικόνα 1.2.2.:** Oscillatoria ανήκει στην κατηγορία των πράσινων-μπλε φυκών ([www.sciencephotogallery.com](http://www.sciencephotogallery.com), 20/01/2024).

**Εικόνα 1.2.3.:** Gloeochaete wittrockiana- γλαυκόφυτο (<https://www.inaturalist.org/observations/28607802>, 20/01/2024)

**Εικόνα 1.2.4.:** Αναλυτική διαίρεση της τάξης των κόκκινων φυκών, με τις κύριες τους υποκατηγορίες να είναι τα πρωτεοροδόφυτα και τα κυανιδόφυτα (Borjas Esqueda A. et.al, 2022)

**Εικόνα 1.2.5.:** Βιοποικιλότητα, κατανομή και εκτιμώμενος αριθμός ειδών φυκών (Journal of Industrial Microbiology, 1996).

**Εικόνα 1.4.1.:** Σχηματική αναπαράσταση της ανοικτής δεξαμενής σχεδιασμού raceway. Διακρίνονται οι στρόφες, η προπέλα που δίνει τη ροή κατεύθυνσης και με κόκκινο βέλος η εισαγωγή νέου θρεπτικού

**Εικόνα 1.4.2.:** Ανοικτό σύστημα raceway

**Εικόνα 1.4.3.:** Φωτοβιοαντιδραστήρας με τεχνητή πηγή φωτός **Εικόνα**

**1.4.4.:** Σχηματική αναπαράσταση σωληνοειδούς PBR ο οποίος κάνει χρήση ηλιακού φωτός.

**Εικόνα 1.4.5.:** Σωληνοειδής PBR ο οποίος κάνει χρήση ηλιακού φωτός. **Εικόνα**

**2.2.1.:** Απεικόνιση χημικής δομής α-χλωροφύλλης.

**Εικόνα 2.2.2.:** Απεικόνιση χημικής δομής ορισμένων σημαντικών καροτενοειδών. **Εικόνα**

**2.2.3.:** Απεικόνιση χημικής δομής ασταξανθίνης, ζεαξανθίνης και κανθαξανθίνης. **Εικόνα**

**2.4.1.:** Οι 5 πιο δημοφιλείς πηγές εναλλακτικών πρωτεϊνών. **Εικόνα 2.4.2.:**

Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών προϊόντων που προέρχονται από μικροφύκη με βάση την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες (Soto-Sierra L. et al., 2018).

**Εικόνα 2.5.1.:** Απεικόνιση χημικής δομής του ελαϊκού και παλμιτικού οξέων. **Εικόνα 2.5.2.:** Απεικόνιση μοριακής δομής του α – λινολενικού και εικοσαπενταενικού οξέων. **Εικόνα 2.6.1.:** Απεικόνιση χημικής δομής των: γαλλικό οξύ (gallic acid), πρωτοκατεχικό οξύ (protocatechuic acid), καφεϊκό οξύ (caffeic acid), χλωρογενικό οξύ (chlorogenic acid), βανιλικό οξύ (vanillic acid), p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (p-hydroxybenzoic acid) και σαλικυλικό οξύ (salicylic acid)

**Εικόνα 2.6.2.:** Απεικόνιση χημικής δομής φλωροτανίνης.

**Εικόνα 3.1.1.:** Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης υγρών (Laitinen 1999). **Εικόνα 3.1.2.:** Τρεις μέθοδοι της εκχύλισης με υπερήχους: (a) λουτρό-, (b) κόρνας και (c) εστιασμένου-τύπου υπερήχων (Hosikian et.al, 2010)

**Εικόνα 4.3.1.:** Πιθανοί κυτταρικοί μηχανισμοί για την αντικαρκινική δράση των μικροφυκών και ο πιθανός ρόλος των συμμετεχόντων μορίων (Abd El-Hack, M. E et al., 2019). **Εικόνα 4.4.1.:** Μοριακές δομές (α) του εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA) και (β) του δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (DHA).

**Εικόνα 5.1.1.:** Αριθμός δημοσιευμένων άρθρων με θέμα «Μικροάλγη και βιοδραστικά συστατικά» από τον Ιανουάριο 1991 ως το Δεκέμβριο του 2021 (Amrofo, J, 2022). **Εικόνα 5.1.2.:** Κύριες τάξεις των μικροφυκών με τα πιο σημαντικά τους είδη τα οποία σχετίζονται χρήσιμες βιολογικές δράσεις (<https://www.enhancemicroalgae.eu/wp-content/uploads/2020/05/EMA-Strain-catalogue-2nd-Edition.pdf>).

**Εικόνα 5.1.3.:** Λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας τα οποία είναι χρήσιμα στην τεχνολογία τροφίμων με προέλευση τα μικροφύκη (Angelo Paggi Matos, 2017) **Εικόνα 5.1.4.:** Χρωστικές μικροφυκών και τα δυνητικά πεδία εφαρμογής τους (Angelo Paggi Matos ,2017)

**Εικόνα 5.1.5.:** Σχηματική αναπαράσταση των ευεργετικών ιδιοτήτων αλλά και τα τρόφιμα στα οποία εφαρμόζονται οι ενώσεις που παράγονται από τα μικροφύκη (Amrofo ,2022)

**Εικόνα 5.1.6.:** Ψωμί συμπληρωμένο με διαφορετικά μικροφύκη: (A) Tetraselmis sp. και Nannochloropsis sp. (1%3% κ.β./κ.β.) (B) Chlorella vulgaris (0%5% κ.β./κ.β.) (Γ) ψωμί χωρίς γλουτένη με Arthrospira platensis (2%5% κ.β./κ.β) (Δ) ψωμί χωρίς γλουτένη με Chlamydomonas sp. και Nannochloropsis gaditana (1% και 3% κ.β./κ.β) (E) "κροστίνι" από προζύμι με (2%, 6% και 10% (κ.β./κ.β.) Arthrospira platensis (Alice Ferreira et al., 2021) **Εικόνα 5.1.7.:** Το Ap αντιστοιχεί στο A. Platensis, το Cv στο C. Vulgaris, το Ts στο T. Suecica και το Pt στο P. Tricornutum τα οποία έχουν ενσωματωθεί ως βιομάζα σε αναλογία από 2-6% στα σνακ (Amrofo, 2022)

**Εικόνα 5.1.8.:** Προϊόντα κρέατος εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες από Arthrospira sp. και

*Chlorella* sp. σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα (πρωτεΐνη σόγιας): (Α) φρέσκα λουκάνικα, (Β) Κοτόπουλο Roti (Γ) μοσχαρίσια μπιφτέκια (Alice Ferreira et.al, 2021) **Εικόνα 5.2.1.:** Απεικόνιση από ορισμένα στελέχη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια

**Εικόνα 5.2.2.:** Τεχνική 'πράσινου νερού' με τη βοήθεια μικροφυκών για την καλλιέργεια της γαρίδας Tiger. (Α) Καλλιέργεια μικροφυκών σε ανοιχτές δεξαμενές (Β) Δεξαμενές μικρής κλίμακας για την καλλιέργεια γαρίδας με μικροφύκη, (Γ) Ανοιχτές λίμνες για μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια γαρίδας με τη βοήθεια μικροφυκών και (Δ) Γαρίδες τίγρης που καλλιεργούνται με τη χρήση τροφής από μικροφύκη (Dillirani Nagarajan et al., 2021) **Εικόνα 5.3.1.:** Συγκεντρωτική εικόνα των εφαρμογών των συστατικών των μικροφυκών στον τομέα της φαρμακευτικής (Fatemeh Khavari, 2021)

**Εικόνα 5.4.1.:** Τομείς εφαρμογής των ενεργών συστατικών που προέρχονται από θαλάσσια μικροφύκη και κυανοβακτήρια στη φροντίδα του δέρματος και τα καλλυντικά (Mourelle, 2017).

**Εικόνα 6.2.1.:** Προβλήματα υγείας που συνδέονται με την κατανάλωση κυανοβακτηρίων και των τοξινών τους (Aswathy Udayan et al., 2021)

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

**Διάγραμμα 3.1.1.** Σχήμα τροποποιημένης μεθόδου Folch για την εκχύλιση λιπιδίων από κύτταρα μικροφυκών (Salinas-Salazar C. et. al, 2019).

**Διάγραμμα 3.1.2.** Διάγραμμα της μεθόδου εκχύλισης Soxhlet για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη (C.Salinas-Salazar et. al, 2019).

**Διάγραμμα 3.1.3.** Διάγραμμα της μεθόδου Bligh-Dyer για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη (C.Salinas-Salazar et. al, 2019).

**Διάγραμμα 3.2.1.** Πρωτόκολλο της ανάλυσης HPLC-MS για την ανάλυση λιπιδίων μικροφυκών (Kiani H et.al, 2022).

## Κεφάλαιο 1: Μικροφύκη: Ποικιλομορφία και καλλιέργεια

### 1.1. Επισκόπηση μικροφυκών

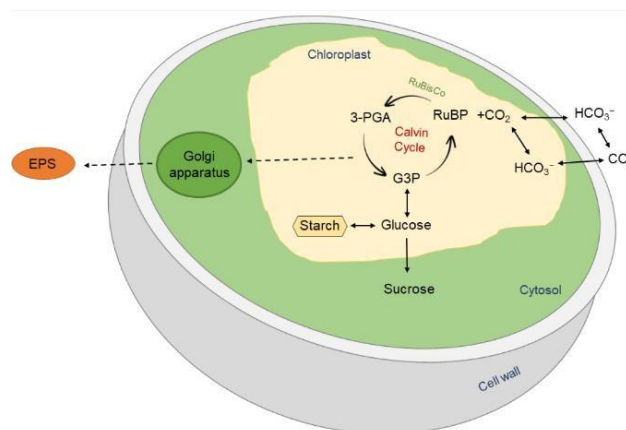
Τα φύκη θεωρούνται ως μία από τις παλαιότερες μορφές ζωής (Falkowski PG & Raven JA, 2013) και περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα οργανισμών από διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες που αντιπροσωπεύουν πολλές ταξινομικές διαιρέσεις. Αυτή η φυλογενετική ποικιλομορφία είναι πολύ ευρεία και αντικατοπτρίζεται σε ένα εξίσου ευρύ φάσμα μεταβολικών και βιοχημικών ιδιοτήτων. Περιλαμβάνουν ευκαρυωτικούς οργανισμούς, φωτοαυτότροφα πρώτιστα και προκαρυωτικά κυανοβακτήρια. Γενικά, είναι πρωτόγονα φυτά (Θαλλόφυτα *thallophytes*), στα οποία δεν υπάρχουν ρίζες, μίσχοι, φύλλα, αγγειακοί ιστοί (Khan SA et al., 2009; Brennan L. & Owende P., 2010). Τα περισσότερα από τα φύκη περιέχουν χλωροφύλλη από την ύπαρξη της οποίας αποκτούν χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Ωστόσο, ορισμένα δεν παρουσιάζουν πράσινο χρώμα, αλλά καφέ ή κόκκινο, λόγω της παρουσίας άλλων χρωστικών, όπως το καροτένιο (Wang J. & Chen C., 2009). Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί συμβάλλουν στο ήμισυ της παγκόσμιας φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (Norton T.A., 1996). Επιπλέον, τα μικροφύκη αποτελούν πηγή της τροφικής αλυσίδας για περισσότερο από το 70% της παγκόσμιας βιομάζας (Wiessner W. et al., 1995).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για τη μοριακή βιολογία, τα φύκη νοούνται ως μια ομάδα μικροοργανισμών που έχουν αποκτήσει ανεξάρτητα χλωροπλάστες, δηλαδή ενδοκυτταρικές δομές, χρησιμοποιώντας δικούς τους μηχανισμούς φωτοσύνθεσης (Gibbs S.P., 1992). Θεωρούνται ως οξυγόνο-εξελικτικά φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί που περιέχουν χλωροφύλλη ως πρωταρχική φωτοσυνθετική χρωστική και αναπτύσσονται σε διάφορα υδρόβια περιβάλλοντα (γλυκά, θαλάσσια και υφάλμυρα ύδατα), συμπεριλαμβανομένων των θερμών πηγών (Wang J. & Chen C., 2009). Μερικά είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε βράχους, εδάφη, φυτά κ.λπ., με ελάχιστες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (Zhou W., 2014). Αυτό το χαρακτηριστικό ορίζει τα περισσότερα φύκη ως αυτότροφα. Υπάρχουν βέβαια ορισμένα είδη φυκών που είναι και αυτότροφα και ετερότροφα (μιξότροφα) ενώ μερικά άλλα είναι κυρίως ετερότροφα. Η φωτοσύνθεση των φυκών βασίζεται κυρίως στον κύκλο Calvin, όπου η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη αντιδρά με CO<sub>2</sub> για τη σύνθεση 3-φωσφογλυκερικού οξέος (3-PGA), το οποίο καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής γλυκόζης και άλλων μεταβολιτών (John R.P. et al., 2011).

Πιο αναλυτικά, οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα ευκαρυωτικά μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια, απορροφούν την ηλιακή ενέργεια και τη μετατρέπουν σε χημική ενέργεια



μέσω μιας σειράς διαδοχικών αντιδράσεων που ονομάζεται φωτοσύνθεση. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι φωτοσυνθετικών αντιδράσεων, οι φωτεινές και οι σκοτεινές αντιδράσεις. Στις φωτεινές αντιδράσεις, η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από τις χρωστικές ουσίες των φωτοσυνθετικών κεραιών και χρησιμοποιείται για τη διάσπαση του νερού σε οξυγόνο, πρωτόνια και ηλεκτρόνια τα οποία χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την παραγωγή φορέων ενέργειας (NADPH και ATP), οι οποίοι υποστηρίζουν τις μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού (Markou G. et al., 2012). Στις σκοτεινές αντιδράσεις, το διοξείδιο του άνθρακα ανάγεται σε υδατάνθρακες μέσω του κύκλου Calvin, χρησιμοποιώντας την ενέργεια που προέρχεται από το NADPH και το ATP (Markou G. et al., 2012) (Εικόνα 1.1.1.).



**Εικόνα 1.1.1.** Ενδεικτική αναπαράσταση της σύνθεσης υδατανθράκων στο κύτταρο μικροφυκών ( $\text{CO}_2$ : διοξείδιο του άνθρακα, EPS: εξωπολυσακχαρίτης, G3P: φωσφορική γλυκεραλδεΐδη-3,  $\text{HCO}_3^-$ : διττανθρακικό, RuBP: ριβουλόζη-1,5-διφωσφορική, 3-PGA: φωσφογλυκερικό) (Moreira, J. B. et al., 2022).

Στην εφαρμοσμένη φυκολογία, ο όρος μικροφύκη καλύπτει όλους τους μονοκύτταρους και απλούς πολυκύτταρους οξυγόνο-φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που έχουν ως κοινή φωτοσυνθετική χρωστική ουσία τη χλωροφύλλη «α». (Richmond A. & Hu Q., 2013). Η βιοποικιλότητα των μικροφυκών είναι εξαιρετική και υπολογίζεται ότι στη φύση υπάρχουν από 200.000 είδη έως αρκετά εκατομμύρια. Ωστόσο, ένας πολύ περιορισμένος αριθμός έχει μελετηθεί και αναλυθεί (Mata T. et al., 2010). Μεταξύ των μικροφυκών, οι πιο σημαντικές ομάδες από άποψη αφθονίας είναι τα διάτομα, τα πράσινα φύκη, τα γαλαζοπράσινα φύκη και τα χρυσά φύκη (Εικόνα 1.1.2).

Sl No	Algae	Known species (near about)	Morphology	Storage material	Habitat
1	Diatoms (Bacillariophyceae)	100,000	Unicellular	Chrysolaminarin (polymer of carbohydrates) and TAGs oceans	Fresh and brackish water
2	Green algae (Chlorophyceae)	8,000	Unicellular to leafy	Starch and TAGs	Freshwater, brackish water
3	Blue-green algae (Cyanophyceae)	2,000	Unicellular	Starch and TAGs	Different habitats
4	Golden algae (Chrysophyceae)	1,000	Unicellular	TAGs and carbohydrates	Freshwater

**Εικόνα 1.1.2.:** 4 σημαντικές κλάσεις μικροφυκών, ο αριθμός των ειδών τους, και τα ενδιαιτήματά τους (Khan SA et al., 2009)

Τα μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες υδατανθράκων (Melis A. & Harpe T., 2001). Τα μικροφύκη μπορούν να μετατρέψουν περίπου το 6% της συνολικής ενέργειας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε φρέσκια βιομάζα (Odum H.T., 1971). Συγκριτικά, μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι χερσαίες καλλιέργειες συνήθως παρουσιάζουν μικρότερη αποδοτικότητα στη φωτοσυνθετική μετατροπή.

Επιπλέον, τα φύκη μπορεί να είναι μονοκύτταρα ή να συγκροτούν αποικίες. Στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι διατεταγμένα από άκρη σε άκρη, τα φύκη ονομάζονται νηματώδη και ενδέχεται να είναι σε μορφή μη διακλαδισμένων νηματίων ή σε διακλαδισμένων (Wang J. & Chen C., 2009). Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι οργανισμοί με μέγεθος που κυμαίνεται από 2 έως 200 μm, ενώ τα μακροφύκη είναι πολυκύτταροι οργανισμοί με μερικά να φτάνουν και τα 30m (Madigan MT et al., 1997; Wang J. & Chen C., 2009; Mutanda T. et al., 2011). Συνεπώς, τα περισσότερα είδη δεν είναι παρατηρήσιμα ως μεμονωμένα δείγματα και παρατηρούνται μόνο όταν παράγονται μεγάλοι πληθυσμοί, συνήθως με τη μορφή μαύρων, πράσινων, κόκκινων ή καφέ κηλίδων.

Το ευκαρυωτικό κύτταρο των μικροφυκών περιβάλλεται από ένα λεπτό, άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. Ορισμένα διαθέτουν μια εξωτερική μήτρα που βρίσκεται έξω από το κυτταρικό τοίχωμα, παρόμοιο με τα βακτηριακά καψίδια. Το κυτταρικό τοίχωμα παρέχει ένα φράγμα μεταξύ του περιβάλλοντος εκτός και εντός του κυττάρου. Αποτελείται από ένα δίκτυο ινιδίων κυτταρίνης με την προσθήκη πολυσακχαριτών, όπως η πηκτίνη. Το κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών περιέχει μικρούς πόρους περίπου 3-5 nm, που επιτρέπουν τη διέλευση αποκλειστικά ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους όπως νερό, ανόργανα ιόντα, αέρια και

θρεπτικά συστατικά, όχι όμως μακρομόρια (Wang J. & Chen C., 2009). Η σύσταση των μικροφυκών αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το κύριο οργανικό συστατικό, ακολουθούμενες από τα λιπίδια και στη συνέχεια τους υδατάνθρακες. Τα περισσότερα από τα μικροφύκη διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και χρησιμοποιούνται ως μη συμβατική πηγή πρωτεΐνης στα συμπληρώματα διατροφής (Soletto D. et al., 2005). Τα κύτταρα των μικροφυκών περιέχουν όλες τις απαραίτητες βιταμίνες όπως A, B1, B2, B6, C, E (Spolaore P. et al., 2006; Kirrolia A. et al., 2013). Οι υδατάνθρακες στα μικροφύκη βρίσκονται κυρίως με τη μορφή αμύλου, γλυκόζης, σακχάρων και άλλων πολυσακχαριτών (Wang J. & Chen C., 2009; Kirrolia A. et al., 2013). Η περιεκτικότητα των μικροφυκών σε λιπίδια ποικίλλει από είδος σε είδος. Γενικά, τα μικροφύκη εμφανίζουν μέση περιεκτικότητα λιπιδίων σε ποσοστό 5–20 % και ενδέχεται να ανέλθει έως και 80–90 % του ξηρού τους βάρους υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Εικόνα 1.1.3) (Hu Q. et al., 2008). Τα λιπίδια των φυκών αποτελούνται κυρίως από γλυκερίνη, κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Μεταξύ των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα μικροφύκη είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως ωμέγα-3, εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA), δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) καθώς και ωμέγα-6, όπως το γ-λινολενικό οξύ (GLA) και αραχιδονικό οξύ (AA), που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ποικίλες διατροφικές εφαρμογές (Spolaore P. et al., 2006).

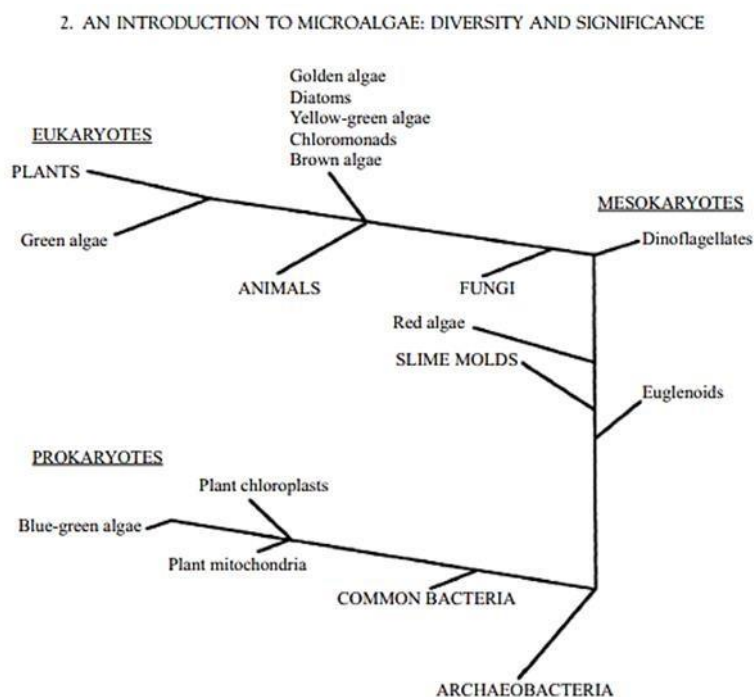
Microalga	Oil content (% dry wt)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15–23
<i>B. braunii</i>	25–75

**Εικόνα 1.1.3.:** Περιεκτικότητα σε έλαια διαφόρων στελεχών των μικροφυκών (Khan SA et al., 2009).

Τα φύκη ταξινομούνται σε περισσότερες από δώδεκα μεγάλες ομάδες, κατά κύριο λόγο σύμφωνα με τη σύνθεση χρωστικής, την αποθήκευση των ουσιών που συνθέτουν και την ποικιλία των δομικών τους χαρακτηριστικών. Η καλλιέργεια τους πραγματοποιείται φωτοσυνθετικά χρησιμοποιώντας ηλιακή ενέργεια και διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα σε λιμνοθάλασσες ή δεξαμενές ή τεχνητές λίμνες. Επιπλέον, για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιούνται κλειστές δεξαμενές ή βιοαντιδραστήρες με ελεγχόμενες συνθήκες (Carlsson AS et al., 2007).

## 1.2. Ταξινόμηση μικροφυκών

Η επιστημονική βιβλιογραφία υποδεικνύει την ύπαρξη 200.000 έως αρκετών εκατομμυρίων ειδών μικροφυκών σε σύγκριση με τα περίπου 250.000 είδη ανώτερων φυτών (Norton T.A. et al., 1996). Όπως παρουσιάζεται στο φυλογενετικό σχήμα (Εικόνα 1.2.1.) υπάρχουν διάφορες ομάδες φυκών. Τα γαλαζοπράσινα φύκη γνωστά ως κυανοβακτήρια, κατατάσσονται στα προκαρυωτικά, τα οποία συνδέονται με πολλά κοινά βακτήρια. Τα πράσινα φύκη είναι στενά συνδεδεμένα με ανώτερα φυτά. Οι μεσοκαρυώτες (δινόφυκη και ευγλενόφυτα) κατέχουν ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι ενδιάμεσα μεταξύ των προκαρυωτών και των ευκαρυωτών (Lee R.E., 1989). Αυτοί οι μεσοκαρυώτες μπορεί να συνδέονται στενότερα με τα κόκκινα φύκη.



Εικόνα 1.2.1: Φυλογενετικό σχήμα για τις κατηγορίες των μικροφυκών (BioScience vol. 46, No.4.)

Οι διάφορες κλάσεις των μικροφυκών παρουσιάζονται αναλυτικότερα στο επόμενο υποκεφάλαιο.

### 1.2.1. Γαλάζια - πράσινα φύκη και προχλωρόφυτα

Το σύνολο των γαλαζοπράσινων φυκών και των προχλωρόφυτων είναι Gram-αρνητικά βακτήρια και ταξινομούνται στην κατηγορία οξυγονο-φωτό βακτήρια (Castenholz RW & Waterbury JB, 1989; Murray RGE, 1984). Μεταξύ των περίπου 2.500 ειδών μπλε-πράσινων φυκών περιλαμβάνονται μονοκυτταρικές, κοκκώδης, αποικιακές και νηματώδεις μορφές με ή χωρίς διακλάδωση ή διαφοροποίηση εξειδικευμένων κυττάρων (Εικόνα 1.2.2.). Αποτελούν την πρόελευση των πλαστιδίων των ευκαρυωτικών φυτών. Τα θυλακοειδή στα φύκη (φωτοσυνθετικές μεμβράνες) δεν είναι διατεταγμένα σε αντίθεση με τα προχλωρόφυτα και τα περισσότερα άλλα φύκη. Η χρώση περιλαμβάνει τη χλωροφύλλη α και δ, μπλε και κόκκινες φυκοβιλίνες, β-καροτένιο και αρκετές ξανθοφύλλες. Το προϊόν αποθήκευσης είναι το άμυλο των κυανοφυκών και σχηματίζεται με τη μορφή κόκκων μεταξύ των θυλακοειδών (Van den Hoek C. et al., 1995).

Τα προχλωρόφυτα είναι προκαρυωτικά μικροφύκη στην ίδια βακτηριακή διαίρεση και κατηγορία, όπως τα γαλαζοπράσινα φύκη. Διακρίνονται από τα γαλαζοπράσινα δεδομένου ότι διαθέτουν και τα δύο είδη χλωροφύλλης που βρίσκονται στα πράσινα φύκη, στα ευγενοειδή και στα φυτά (α και β χλωροφύλλη). Περιλαμβάνουν το πλαγκτόν που ζει ελεύθερο στα γλυκά και θαλάσσια νερά (Palenik B. & Haselkorn R., 1992).

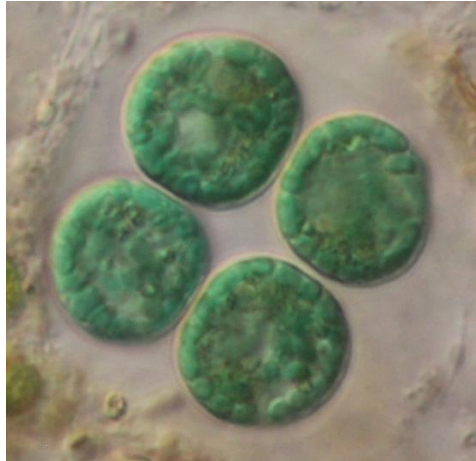


**Εικόνα 1.2.2.:** *Oscillatoria* ανήκει στην κατηγορία των πράσινων-μπλε φυκών ([www.sciencephotogallery.com](http://www.sciencephotogallery.com), 20/01/2024).

### 1.2.2. Γλαυκόφυτα

Η συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνει τρία γένη διμαστιγωτών μονοκύτταρων μικροφυκών των οποίων οι χλωροπλάστες ομοιάζουν έντονα με αυτούς των

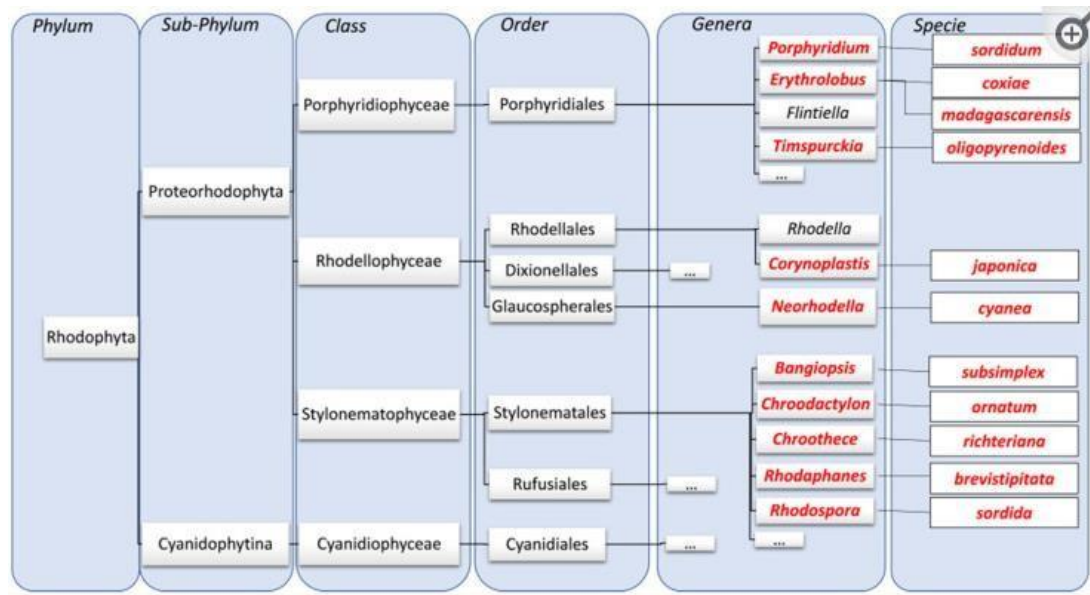
γαλαζοπράσινων φυκών, καθώς τα θυλακοειδή δεν στοιβάζονται και περιβάλλονται από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Επίσης, τα γλαυκόφυτα διαθέτουν χλωροφύλλη α και φυκοβιλίνες, αν και το φάσμα των ξανθοφύλλων που υπάρχουν είναι μικρότερο (Εικόνα 1.2.3) (Van den Hoek C. et al., 1995).



**Εικόνα 1.2.3.** : *Gloeochaete wittrockiana*- γλαυκόφυτο  
(<https://www.inaturalist.org/observations/28607802>, 20/01/2024)

### 1.2.3. Κόκκινα φύκη

Τα κόκκινα φύκη (*Rhodophyta*) (Εικόνα 1.2.4) διακρίνονται από τα υπόλοιπα λόγω έλλειψης μαστιγίων και την παρουσία βοηθητικών χρωστικών, όπως της φυκοβιλίνης. Διαθέτουν επίσης χλωροπλάστες με μεμονωμένα θυλακοειδή ενώ χρησιμοποιούν μόνο τη χλωροφύλλη α για τη φωτοσύνθεση. Άλλες χρωστικές είναι το β-καροτένιο, η ζεαξανθίνη και ορισμένες ξανθοφύλλες. Μπορούν να εντοπιστούν σε όλον τον κόσμο, στις ακτές της θάλασσας καθώς και στο γλυκό νερό και στο έδαφος και ως ενδοσυμβιώτες (Van den Hoek C. et al., 1995).



**Εικόνα 1.2.4.:** Αναλυτική διαίρεση της τάξης των κόκκινων φυκών, με τις κύριες τους υποκατηγορίες να είναι τα πρωτεοροδόφυτα και τα κυανιδόφυτα (Borjas Esqueda A. et al., 2022)

#### 1.2.4. Κρυπτόφυτα

Τα κρυπτόφυτα (*Cryptophyta*) αποτελούν μια μικρή ομάδα μονοκύτταρων μικροφυκών τα οποία περιέχουν χρωστικές, συμπεριλαμβανομένων των χλωροφυλλών α και γ2 και φυκοβιλινών. Έχουν έναν μεμονωμένο χλωροπλάστη με θυλακοειδή δομή που η δομή του κατηγοριοποιείται ανάμεσα σε αυτών στα κόκκινα φύκη και σε άλλα φυτά. Το κύτταρο περικλείεται από ένα άκαμπτο πρωτεϊνώδες περιπλάστη και είναι κατασκευασμένο από ορθογώνιες ή πολυγωνικές πλάκες. Ο χλωροπλάστης και τα μοναδικά κυτταρικά εγκλείσματα τοποθετούν τα κρυπτόφυτα σε διαφορετική κατηγορία από τα άλλα φύκη. Το άμυλο αποθηκεύεται σε μορφή διακριτών κόκκων και σε ορισμένα είδη αποθηκεύονται επίσης ως έλαια (Van den Hoek C. et al., 1995).

#### 1.2.5. Πράσινα φύκη

Τα πράσινα φύκη (*Chlorophyta*) αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα ως προς τον αριθμό των ειδών και τα πιο διαδεδομένα μορφολογικά φύκη. Τα φυτά πιθανά εξελίχθηκαν απευθείας από τα πράσινα φύκη και παρουσιάζουν όμοια βιοχημικά, μεταβολικά και δομικά χαρακτηριστικά. Τα πράσινα φύκη αποθηκεύουν το άμυλο σε θυλακοειδή τα οποία ταξινομούνται σε δέσμες από δύο έως έξι ελάσματα μέσα σε πλαστίδια που συνδέονται με δύο μεμβράνες. Ως κατηγορία περιλαμβάνουν μονοκύτταρες, αποικιακές, νηματώδεις και

ψευδοπαρεγχυματικές μορφές μονοπύρηνων ή πολυπύρηνων δομών (Van den Hoek C. et al., 1995).

#### 1.2.6. Χλωραραχνιόφυτα

Αποτελεί σπάνια ομάδα η οποία περιλαμβάνει είδη σε δύο γένη τα οποία προκύπτουν ως εξελικτικός συνδυασμός που προκύπτει από την ενδοσυμβίωση ενός αμοιβαδοειδούς, πλασμοδιακού ή φαγοτροφικού ξενιστή με ευγληνόφυτα ή χλωρόφυτα που περιέχουν α και β χλωροφύλλη (Van den Hoek C. et al., 1995).

#### 1.2.7. Ευγληνόφυτα

Τα ευγληνόφυτα μοιράζονται τη χρώση με τα προχλωρόφυτα, τα πράσινα φύκη και τα φυτά, αλλά κατέχουν μοναδικά κυτταρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που τοποθετούν αυτούς τους μικροοργανισμούς πιο κοντά στα τρυπανοσώματα παρά σε οποιαδήποτε ομάδα φυκιών. Το προϊόν αποθήκευσης είναι το παράμυλο, που βρίσκεται ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα. Δεν διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα. Ορισμένα είναι οσμοτροφικά και προαιρετικά φαγοτροφικά και ορισμένα υποχρεωτικά ετερότροφα. Όλα τα ευγενοειδή είναι μικροσκοπικά και περιλαμβάνουν ως επί το πλείστον μη πυρηνικά και μονοκύτταρα μαστιγωτά, αν και τα αποικιακά είδη είναι κοινά (Van den Hoek C. et al., 1995).

#### 1.2.8. Χρωμόφυτα φύκη

Τα χρωμόφυτα φύκη είναι μια ομάδα με μεγάλη ποικιλομορφία, τα περισσότερα από τα οποία μοιράζονται ένα προϊόν αποθήκευσης τη χρυσολαμιναρίνη, μία β-γλυκάνη. Έτσι υπάρχει μια υπεροχή των καροτενοειδών έναντι των χλωροφυλλών που έχει ως αποτέλεσμα όλες οι ομάδες να φέρουν χρυσαφί, χρυσοκαφέ, καφέ ή κιτρινοπράσινο χρώμα αντί για το πράσινο, μπλε-πράσινο ή κόκκινο χρωματισμό που είναι χαρακτηριστικό άλλων μεγάλων κατηγοριών φυκών. Πέντε από τις πολλές κατηγορίες χρωμόφυτων περιέχουν τις χλωροφύλλες α, γ<sub>1</sub> και γ<sub>2</sub>. Τα μικροφύκη σε αυτή την κατηγορία αποθηκεύουν λίπη και έλαια (Van den Hoek C. et al., 1995).

#### 1.2.9. Δινοφύκη

Έχουν μεγάλη ποικιλομορφία σαν κατηγορία και ανήκουν στα πρώτιστα. Εντοπίζονται σε μορφές κοκκοειδών, νηματωδών και αμοιβαδοειδών μικροφυκών τα όποια έχουν αποκτήσει



εξελικτικά πλαστίδια και την ικανότητα της φωτοσύνθεσης μια διαδικασία που έχει συμβεί περισσότερο από μία φορά (O'Kelley CJ, 1993). Διαθέτουν χλωροφύλλες α, γ<sub>1</sub> και γ<sub>2</sub> και ορισμένα καροτενοειδή διαθέτουν και κυτταρικό τοίχωμα. Τα περισσότερα είναι μονοκύτταρα και φέρουν δύο μαστίγια. Αποτελούν σημαντικό μέρος του φυτοπλαγκτού (*phytoplankton*) στην ωκεάνια περιοχή καθώς παράγουν μεγάλο μέρος του οξυγόνου που παράγεται από τη φωτοσύνθεση στους ωκεανούς. Ορισμένα είδη τους μπορούν επίσης να προκαλέσουν τα λεγόμενα Red tides, που μπορούν να οδηγήσουν σε δηλητηριάσεις λόγω της παραγωγής τοξικών ουσιών. Ορισμένα είδη τους είναι αυτοτροφικά, δηλαδή πραγματοποιούν φωτοσύνθεση, ενώ άλλα μπορεί να τρέφονται με άλλους οργανισμούς είναι δηλαδή ετερότροφα (Van den Hoek C. et al., 1995).

Division <sup>a</sup> (common name)	Distinguishing features <sup>b</sup>	Major groups <sup>a</sup> (common name and/or features)	Distribution of microscopic species				Estimated number of species (microalgae and seaweeds) <sup>c</sup>
			Marine	Fresh-water	Terrestrial	Symbiotic	
Cyanophyta (blue-green algae)	Chlorophyll <i>a,d</i> ; phycobilins; β-carotene; zeaxanthin, echinenone, canthaxanthin, myxoxanthophyll, oscillaxanthin, 3 minor xanthophylls; phycobilliins; prokaryotic; Gram-negative cell walls	Chroococcales (Unicellular cocci and rods; binary fission and budding)	+	+	+	+	≈125 described
		Pleurocapsales (Unicellular and aggregate-forming; multiple fission)	+	+	-	-	≈35 described
		Oscillatoriales (Filamentous; binary fission; no specialized cells)	+	+	+	-	1000
		Nostocales (Filamentous; binary fission; specialized cells; heterocysts, akinetes)	+	+	+	+	1000
		Stigonematales (Filamentous; branched; cell division in 3 planes; specialized cells; heterocysts, akinetes and motile, gliding hormonogia)	-	+	+	-	≈35 genera

**Εικόνα 1.2.5.:** Βιοποικιλότητα, κατανομή και εκτιμώμενος αριθμός ειδών φυκών (*Journal of Industrial Microbiology, 1996*).

Prochlorophyta (prochlorophytes)	Chlorophyll <i>a,b</i> ; $\beta$ -carotene; several xanthophylls; phycobilins, prokaryotic; Gram-negative cell walls	Prochlorales (Coccoid and filamentous; binary fission)	+	?	?	+	<10 described
Glaucophyta (glaucophytes)	Chlorophyll <i>a,b</i> ; phycobilins; $\beta$ -carotene; zeaxanthin, $\beta$ -cryptoxanthin; starch; cellulose wall		-	+	-	-	3 described
Rhodophyta (red algae)	Chlorophyll <i>a</i> ; $\alpha$ -, $\beta$ -carotenes; phycobilins; zeaxanthin, 5 minor xanthophylls; floridean starch; cellulose and other cell wall materials	Bangiophycidae Floridophycidae (seaweeds only)	+	+	+	+	5500–20000 (both classes)
Cryptophyta (cryptophytes)	Chlorophyll <i>a,c<sub>2</sub></i> ; $\alpha$ -, $\beta$ -, $\epsilon$ -carotenes; phycobilins; alloxanthin, zeaxanthin, $\alpha$ -1,4 glucan starch; exterior organic periplast		+	+	?	?	1200
Chlorophyta (green algae)	Chlorophyll <i>a,b</i> ; $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -carotenes; zeaxanthin, lutein, violaxanthin, neoxanthin; several minor xanthophylls; starch; diverse cell wall materials, incl cellulose	Micromonadophyceae (prasinophytes)	+	+	?	?	500
		Charophyceae (stoneworts, filamentous microalgae)	+	+	+	?	20500
		Ulvophyceae (seaweeds, filamentous microalgae)	+	+	+	?	3000
		Pleurostrophyceae	+	+	+	+	6 genera
		Chlorophyceae	+	+	+	+	10000–100000

Συνέχεια τις εικόνες 1.2.5. όπου διακρίνεται η βιοποικιλότητα, η κατανομή και ο εκτιμώμενος αριθμός ειδών φυκών (Journal of Industrial Microbiology, 1996).

Euglenophyta (euglenoids)	Chlorophyll <i>a,b</i> ; $\beta$ -, $\gamma$ -carotenes; neoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin; paramylon; wall-like organic pellicle internal to cell membrane		+	+	+	?	2000
Chlorarachniophytes	Chlorophyll <i>a,b</i> ; unknown carotenoids; amoeboid with zoospores		+	-	-	+	2 genera, each with 1 species
Pyrrhophyta <sup>d</sup> (dinoflagellates)	Chlorophyll <i>a,c</i> ; $\beta$ -carotene; diadinoxanthin, diatoxanthin, fucoxanthin, peridinin, 5 minor xanthophylls; $\alpha$ -1,4 glucan starch; cellulose walls		+	+	?	+	3500–11000
Chromophyta (heterokont algae) <sup>e</sup>	Chlorophyll <i>a,c</i> <sub>1</sub> , <i>c</i> <sub>2</sub> , <i>c</i> <sub>3</sub> ; $\alpha$ -, $\beta$ - and $\epsilon$ -carotenes; several major and minor xanthophylls; chrysolaminarin, other glucans, oils; variety of cell wall materials	Chrysophyceae (golden-brown algae)	+	+	?	?	3400
		Bacillariophyceae (diatoms)	+	+	+	?	100000–10000000
		Xanthophyceae (yellow-green algae)	+	+	+	?	2000
		Eustigmatophyceae (eustigmatophytes)	+	+	+	?	1000–10000
		Raphidophyceae (raphidophytes, chloromonads)	+	+	?	?	100
		Prymnesiophyceae (haptophytes or prymnesiophytes, including coccolithophorids)	+	+	?	?	2000

Συνέχεια της εικόνας 1.2.5. όπου διακρίνεται η βιοποικιλότητα, η κατανομή και ο εκτιμώμενος αριθμός ειδών φυκών (*Journal of Industrial Microbiology, 1996.*)

### 1.3. Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των μικροφυκών

Τα πράσινα μικροφύκη αναπτύσσονται συνήθως σε γλυκό και θαλασσινό νερό, ενώ πολλά άλλα είδη μικροφυκών αναπτύσσονται σε εξαιρετικά αλμυρά περιβάλλοντα, όπως στη Great Salt Lake στις ΗΠΑ και στη Νεκρά Θάλασσα στο Ισραήλ. Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτύσσονται στα επιφανειακά στρώματα του νερού και μπορούν να εντοπιστούν μέχρι στα όρια της ζώνης του φωτός, δηλαδή 200 με 300 m κάτω από την επιφάνεια του νερού. Μικροφύκη αναπτύσσονται επίσης στην οργανική ύλη, η οποία βρίσκεται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους, στην άμμο της ερήμου, σε βράχους, στο χιόνι και σε πιο ασυνήθιστες τοποθεσίες, όπως στη γούνα των πολικών αρκούδων. Ένας αριθμός ειδών μικροφυκών απαντάται σχεδόν σε κάθε τύπο χερσαίου περιβάλλοντος (Rindi F. et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια μικροφυκών οφείλουν να παρέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη και τη συντήρησή τους. Όμως, οι βέλτιστες παράμετροι καθώς και το ανεκτό εύρος συνθηκών και συστατικών είναι ειδικές για κάθε είδος και κάθε παράμετρος πρέπει να καθορίζεται ξεχωριστά (Lavens P. & Sorgeloos P., 1996). Όλες αυτές οι παράμετροι όχι μόνο επηρεάζουν

τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και την παραγωγικότητα της κυτταρικής βιομάζας αλλά επηρεάζουν επίσης τα πρότυπα, τα μονοπάτια και τη δράση του κυτταρικού μεταβολισμού και συνεπώς μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή της κυτταρικής σύνθεσης (Richmond A. & Hu Q., 2013). Ως εκ τούτου, κατά την καλλιέργεια μικροφυκών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες με τις σημαντικότερες παραμέτρους να αφορούν την ποσότητα και ποιότητα των θρεπτικών συστατικών, το φως, το CO<sub>2</sub>, τη θερμοκρασία, το pH και την αλατότητα (Grobbelaar JU, 2004).

Οι ελάχιστες θρεπτικές απαιτήσεις μπορούν να εκτιμηθούν χρησιμοποιώντας κατά προσέγγιση τον μοριακό τύπο της βιομάζας των μικροφυκών, δηλαδή CO<sub>0.48</sub>H<sub>1.83</sub>N<sub>0.11</sub>P<sub>0.01</sub> (Grobbelaar JU, 2004). Ο Vonshak A. (1986) καθιέρωσε άλλο μέσο καλλιέργειας μικροφυκών που περιέχει πηγή άνθρακα (οργανική ή ανόργανη), άζωτο, ιχνοστοιχεία και χηλικούς παράγοντες, βιταμίνες, άλατα και άλλα ιοντικά συστατικά (κάλιο, μαγνήσιο, νάτριο, θειικό και φωσφορικό άλας) με βάση την κυτταρική σύνθεση. Ένας τεράστιος αριθμός μέσων καλλιέργειας με διάφορες αναλογίες θρεπτικών συστατικών έχουν σχεδιαστεί, ενώ ορισμένα μέσα προέρχονται από την ανάλυση των νερών στον φυσικό βίοτοπο και την οικολογία των μικροφυκών. Έτσι, έχουν καθιερωθεί μέσα καλλιέργειας ειδικά για τα είδη, ενώ ορισμένα είναι πολύ γενικά και χρησιμοποιούνται για ευρεία ποικιλία μικροφυκών. Μια λεπτομερής έκθεση σχετικά με τα μέσα καλλιέργειας μικροφυκών είναι διαθέσιμη στο Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (<https://www.ccap.ac.uk/>).

Το άζωτο αποτελεί βασικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κύτταρα των φυκών, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 7-10% του ξηρού βάρους των κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW). Η παρουσία του άζωτου είναι απαραίτητη για τη σωστή δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των κυττάρων. Ωστόσο, τα μικροφύκη εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα συγκέντρωσης αζώτου, και η έλλειψή του μπορεί να οδηγήσει σε αποχρωματισμό των κυττάρων λόγω μείωσης της χλωροφύλλης και αύξησης των καροτενοειδών. Η έλλειψη αζώτου επηρεάζει επίσης τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, με αργότερο ρυθμό ενσωμάτωσης άνθρακα από το φως. Αυτό οδηγεί σε ανακατεύθυνση του φωτοσυνθετικά δεσμευμένου άνθρακα προς τα μονοπάτια σύνθεσης υδατανθράκων και λιπιδίων. Για την παροχή άζωτου στα μικροφύκη, χρησιμοποιούνται διάφορες πηγές, όπως ουρία, νιτρικά, και αμμωνία, με τα νιτρικά να θεωρούνται κύρια πηγή λόγω της αποτελεσματικότητάς τους στην υποστήριξη της ανάπτυξης των φυκών (Xin L. et al., 2010).

Εκτός από το άζωτο, ο φωσφόρος αναδεικνύεται ως ένα ακόμη ουσιώδες στοιχείο για πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταφορά ενέργειας και η βιοσύνθεση του νουκλεϊκού οξέος. Εκτός από τα άζωτο και τον φωσφόρο, άλλα σημαντικά στοιχεία που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των μικροφυκών περιλαμβάνουν το θείο, το κάλιο, το νάτριο, τον σίδηρο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, καθώς και ιχνοστοιχεία όπως το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, το μολυβδαίνιο, το κοβάλτιο και το βανάδιο. Επιπλέον, το πυριτικό άλας χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή για ορισμένες καλλιέργειες μικροφυκών, όπως τα διάτομα, για το κυτταρικό τους τοίχωμα. Αυτό συνεισφέρει στη σύνθεση και τη διατήρηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος. Εκτός από τα παραπάνω, ορισμένα μικροφύκη απαιτούν ορισμένες βιταμίνες, όπως η θειαμίνη (B1), η κυανοκοβαλαμίνη (B12) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, η βιοτίνη (Grobbelaar JU, 2004).

Όπως και τα φυτά, τα μικροφύκη εξαρτώνται από το φως ως την κύρια πηγή ενέργειας για την δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και την παραγωγή οργανικής ύλης μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Για να πραγματοποιηθεί η φωτοσύνθεση με αποτελεσματικό τρόπο, τρεις μεταβλητές του φωτός είναι κρίσιμες: η ένταση, η ποιότητα του φάσματος και η φωτοπερίοδος (φωτεινή/σκοτεινή περίοδος) (Lavens P. & Sorgeloos P., 1996). Συνήθως, το πρόβλημα στην καλλιέργεια μικροφυκών συνδέεται με την ένταση του φωτός. Η χαμηλή ένταση προκαλεί φωτοπεριορισμό, ενώ η υψηλή ένταση προκαλεί φωτοαναστολή. Η πηγή φωτός μπορεί να είναι φυσική, όπως το ηλιακό φως, ή τεχνητή που παρέχεται μέσω λαμπών φθορισμού. Η ανάγκη για φως ποικίλλει ανάλογα με την πυκνότητα της καλλιέργειας και το σύστημα καλλιέργειας, όπως το βάθος. Καθώς τα μικροφύκη αναπτύσσονται και αυξάνουν τη βιομάζα τους, η πυκνότητα αυξάνεται. Συνεπώς, τα μικροφύκη που βρίσκονται σε απόσταση από την επιφάνεια σκιάζονται από την καλλιέργεια, λαμβάνοντας μικρότερη ποσότητα φωτός. Το εύρος της ηλιακής ακτινοβολίας κυμαίνεται μεταξύ 400 και 700nm που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα μικροφύκη. Η φωτοπερίοδος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την καλλιέργεια μικροφυκών. Αυτό συμβαίνει διότι η κυτταρική διαίρεση συνήθως λαμβάνει χώρα σε σκοτεινές συνθήκες για πολλές μονοκύτταρες φωτοσυνθετικές καλλιέργειες. Παρόλο που διαφέρει ανάμεσα σε διάφορους οργανισμούς, για βιομηχανικές εφαρμογές που σχετίζονται με την αναλογία μεταξύ του κόστους της ενέργειας και της παραγωγής βιομάζας, συνήθως θεωρείται ότι η βέλτιστη περίοδος είναι περίπου 12-15 ώρες φωτισμού (Harun I. et al., 2014).

Το εύρος της θερμοκρασίας για την καλλιέργεια μικροφυκών ποικίλλει ανάλογα με τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας και τον καλλιεργούμενο οργανισμό. Τα περισσότερα μικροφύκη ανέχονται θερμοκρασίες μεταξύ 16 και 27 βαθμών Κελσίου. Η βέλτιστη

θερμοκρασία για την καλλιέργεια φυτοπλαγκτού κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 20 και 24 βαθμών Κελσίου. Η θερμοκρασία κάτω από τη βέλτιστη μπορεί να μην οδηγήσει στον άμεσο θάνατο των μικροφυκών, αλλά μπορεί να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξής τους. Αντίθετα, υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσουν στον θάνατο των περισσότερων μικροφυκών.

Η συνολική συγκέντρωση αλάτων στο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από την οικολογική προέλευση του οργανισμού. Οι μεταβολές στην αλατότητα επηρεάζουν συνήθως τα μικροφύκη με τρεις τρόπους: ωσμωτικό στρες, ιοντικό στρες και μεταβολές στην κυτταρική συγκέντρωση ιόντων λόγω της επιλεκτικής διαπερατότητας των ιόντων μέσω της μεμβράνης. Τα θαλάσσια μικροφύκη είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στις μεταβολές της αλατότητας. Οι περισσότεροι οργανισμοί αναπτύσσονται καλύτερα σε αλατότητα που είναι ελαφρώς χαμηλότερη από αυτήν του φυσικού τους περιβάλλοντος. Έχει εντοπιστεί ότι αλατότητες περίπου 2,0-2,5‰ είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη μικροφυκών (Lavens P. & Sorgeloos P., 1996).

Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται στο εύρος pH 7-9, με το βέλτιστο εύρος να κυμαίνεται περίπου από 8,2 έως 8,7 (Lavens P. & Sorgeloos P., 1996). Κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας, το pH αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω της συνεχούς κατανάλωσης CO<sub>2</sub>. Εάν το pH δεν διατηρηθεί εντός του βέλτιστου εύρους, μπορεί να προκαλέσει διαταραχές σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης της βιομάζας. Για να διατηρηθεί το pH στο επιθυμητό επίπεδο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αερισμός είτε προσθήκη επιπλέον CO<sub>2</sub> στο καλλιεργητικό περιβάλλον.

Η συνεχής ανακίνηση και μίξη της καλλιέργειας είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή παραγωγή βιομάζας μικροφυκών. Η ανάμιξη διασφαλίζει την ομοιόμορφη διανομή των θρεπτικών συστατικών, του φωτός, του διαλυμένου CO<sub>2</sub>, εξασφαλίζει την εξάλειψη του O<sub>2</sub>, συντηρεί το pH, διατηρεί τη θερμοκρασία και αποτρέπει το σχηματισμό ιζήματος από τα φύκη (Lavens P. & Sorgeloos P., 1996).

#### 1.4. Συστήματα καλλιέργειας

Οι περιοχές στη Μεσόγειο θάλασσα μεταξύ 45 και 30 γεωγραφικών μοιρών είναι κατάλληλες περιοχές για την καλλιέργεια φυκών, ιδίως στα εδάφη στα νότια της Μεσογείου επικρατούν θερμότερα κλίματα όπου η θερμοκρασία διατηρείται έως τους 15°C καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Singh J. & Gu S., 2010), διευκολύνοντας την ανάπτυξη φυκών στην ύπαιθρο ή σε κλειστά σύστημα δεξαμενών. Οι περιγραφόμενες συνθήκες ενδέχεται να αποτελούν τον αποτελεσματικότερο, οικονομικότερο και ευνοϊκότερο τρόπο για την ανάπτυξη βιομάζας

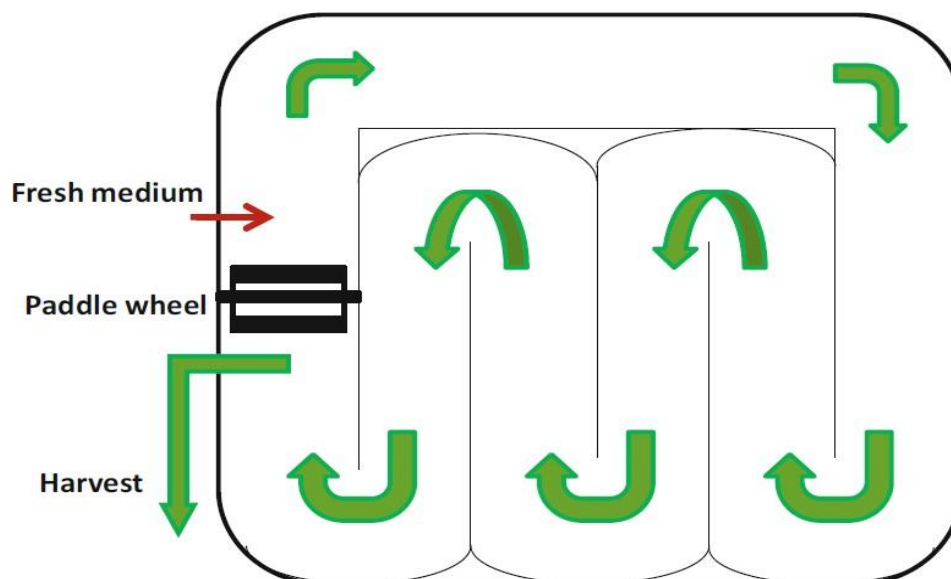
φυκών. Παρόλα αυτά καινοτόμες τεχνολογίες που εφαρμόζονται στη συγκομιδή φυκών παρουσιάζουν επιτυχία σε ανοικτές δεξαμενές που βρίσκονται σε ελαφρώς ψυχρότερες περιοχές. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται κάλυψη των δεξαμενών με ειδικό υλικό ώστε να συμπεριφέρονται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν ενός θερμοκηπίου. Στο τέλος της ενότητας υπάρχει ένας πίνακας (Πίνακας 1.4.1) στον οποίο συγκρίνονται όλες οι μέθοδοι μεταξύ τους.

#### 1.4.1. Συστήματα ανοικτών δεξαμενών

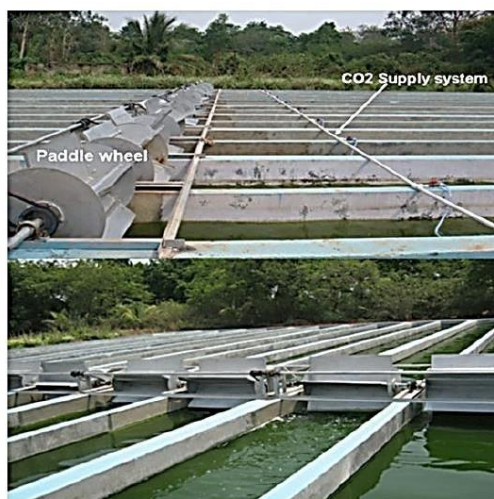
Τα κλασικά συστήματα υπαίθριας καλλιέργειας περιλαμβάνουν δεξαμενές και φυσικές λίμνες, κυκλικές δεξαμενές, μακρόστενες δεξαμενές και κεκλιμένα συστήματα και αποτελούν τα πιο ευρέως διαδεδομένα συστήματα ανάπτυξης μικροφυκών, καθώς η κατασκευή τους είναι οικονομικότερη και πιο εύκολη με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και μεγαλύτερη παραγωγική ικανότητα από ό,τι τα περισσότερα κλειστά συστήματα. Αξιοποιούν το ηλιακό φως και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται μέσω του νερού που απορρέει από κοντινές εκτάσεις ή διοχετεύοντας το νερό από τα λύματα και νερά εργοστασίων ή βιολογικών καθαρισμών καθιστώντας την έτσι την οικονομικότερη μέθοδο σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή (Carlsson AS et al., 2007).

Οι δεξαμενές μακρόστενου σχήματος (raceway) (Εικόνες 1.4.1, 1.4.2) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα καθώς σχεδιάζεται συνήθως σε διάταξη "αγωνιστικού δρόμου" ή "πίστας". Έχουν βάθος μεταξύ 0,2 και 0,5 m, στην οποία μια προπέλα κατευθύνει την κυκλοφορία και την ανάμιξη των μικροφυκών και των θρεπτικών ουσιών. Συνήθως κατασκευάζονται από σκυρόδεμα ή με σκάψιμο στο έδαφος και η επικάλυψή του είναι με πλαστικό υλικό. Η τροφοδοσία καθαρού διοξειδίου του άνθρακα ή του μείγματος αέρα-CO<sub>2</sub> πραγματοποιείται συνήθως μέσω σωλήνων κατά μήκος των καναλιών. Η επιφανειακή εξάτμιση έχει ως αποτέλεσμα απώλεια υγρών, αλλά βοηθά στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του μέσου. Η συλλογή της βιομάζας πραγματοποιείται στο πίσω τμήμα της προπέλας, με την ολοκλήρωση του κύκλου κυκλοφορίας. Αν και τα συστήματα αυτά είναι οικονομικά, αποδοτικά και εύκολα στη λειτουργία, παρουσιάζουν σημαντικές τεχνικές προκλήσεις καθώς είναι ευαίσθητα στις καιρικές συνθήκες, χωρίς έλεγχο των φυσικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία του νερού, η εξάτμιση και ο φωτισμός. Επιπλέον, η παραγωγικότητα της βιομάζας περιορίζεται επίσης από τη μόλυνση με ανεπιθύμητα είδη φυκών καθώς και από οργανισμούς που τρέφονται με φύκη. Κατά συνέπεια, περιορίζονται αυστηρά τα είδη των φυκών που μπορούν να καλλιεργηθούν σε τέτοιου είδους συστήματα. Ως αποτέλεσμα, πολύ λίγα είδη με υψηλή προσαρμοστικότητα στην αλατότητα (*Dunaliella*), στην αλκαλικότητα

(*Spirulina*) (Carlsson AS et al., 2007) και σε συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά (*Chlorella*) έχουν καλλιεργηθεί με επιτυχία μέχρι σήμερα.



**Εικόνα 1.4.1.:** Σχηματική αναπαράσταση της ανοικτής δεξαμενής σχεδιασμού *raceway*. Διακρίνονται οι στροφές, η προπέλα που δίνει τη ροή κατεύθυνσης και με κόκκινο βέλος η εισαγωγή νέου θρεπτικού.



**Εικόνα 1.4.2.:** Ανοικτό σύστημα *raceway*

#### 1.4.2. Κλειστά συστήματα: Φωτοβιοαντιδραστήρες

Οι φωτοβιοαντιδραστήρες (Photobioreactors, PBRs) παρέχουν τη δυνατότητα ελέγχου σχεδόν όλων των βιοτεχνολογικά σημαντικών παραμέτρων της καλλιέργειας. Παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης και απώλειες CO<sub>2</sub>, ιδανικές συνθήκες για την αύξηση του



πληθυσμού της καλλιέργειας, ελεγχόμενη υδροδυναμική και θερμοκρασία και ευέλικτο τεχνικό σχεδιασμό (Pulz O., 2001). Πρόσφατες εξελίξεις στη μαζική καλλιέργεια μικροφυκών απαιτούν κλειστά συστήματα, καθώς πολλά από τα νέα προϊόντα υψηλής αξίας που παράγονται από τα μικροφύκη και χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική βιομηχανία και στη βιομηχανία καλλυντικών οφείλουν να καλλιεργούνται χωρίς ρύπους, όπως τα βαρέα μέταλλα, και μολυσματικούς παράγοντες, όπως οι μικροοργανισμοί (Janssen M. et al., 2003). Επιπλέον, οι κλειστοί βιοαντιδραστήρες υποστηρίζουν έως και πενταπλάσια παραγωγικότητα σε σχέση με τον όγκο του αντιδραστήρα και κατά συνέπεια έχουν μικρότερο "αποτύπωμα" σε σχέση με την απόδοση εκτός από την εξοικονόμηση νερού, ενέργειας και χημικών ουσιών (Πίνακας 1.4.1.). Έτσι, επιτρέπουν ουσιαστικά την καλλιέργεια μικροφυκών ενός είδους για παρατεταμένη διάρκεια (Schenk PM et al., 2008).

Οι PBRs κατασκευάζονται γενικά από γυαλί/ίνες/πλαστικό με επαρκή αντοχή. Λαμβάνουν ηλιακό φως είτε άμεσα μέσω των διαφανών τοιχωμάτων του δοχείου είτε έμμεσα μέσω φωτεινών σωλήνων που το διοχετεύουν από συλλέκτες ηλιακού φωτός. Ορισμένα συστήματα PBR διαθέτουν τεχνητές πηγές φωτός (Εικόνα 1.4.3). Το έδαφος κάτω από τον ηλιακό συλλέκτη είναι συχνά βαμμένο λευκό ή καλυμμένο με λευκά φύλλα πλαστικού για να αυξηθεί το φως που δέχεται από τους σωλήνες. Η ανάδευση επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία της καλλιέργειας ή μέσω έγχυσης αέρα στο υγρό μέσο της καλλιέργειας. Οι κύριες κατηγορίες σχεδιασμού περιλαμβάνουν:

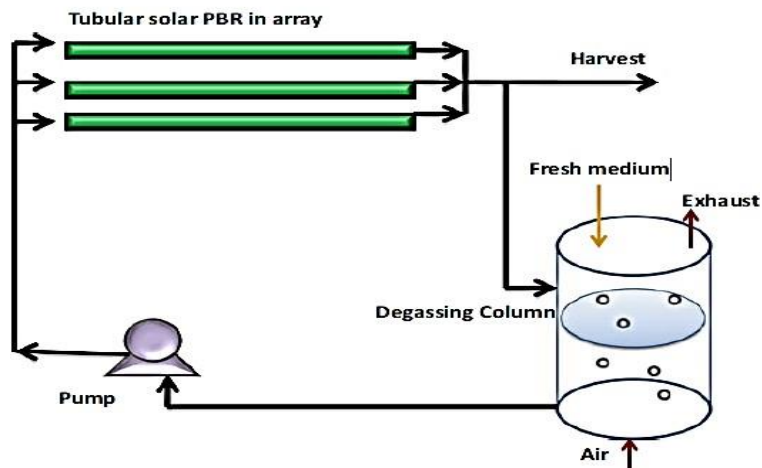
- τους σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες (Εικόνα 1.4.3) (ελικοειδείς, πολλαπλούς φιδωτούς και σχήματος α),
- τις επίπεδες πλάκες (κυψελιδωτές πλάκες και γυάλινες πλάκες),
- τις στήλες (με φυσαλίδες και αεραγωγούς) και
- τους αντιδραστήρες με αναδευόμενη δεξαμενή.

Ένας PBR έχει είσοδο για φρέσκα θρεπτικά συστατικά, έξοδο για επανακυκλοφορία ή συγκομιδή και στήλη για την απομάκρυνση των αερίων με σκοπό την καθίζηση.



*Εικόνα 1.4.3.: Φωτοβιοαντιδραστήρας με τεχνητή πηγή φωτός*

Οι σωληνοειδές PBRs διαθέτουν οριζόντιους διαφανείς σωλήνες για το ηλιακό φως που περικλείει την καλλιέργεια, με τη διάμετρο των σωλήνων να είναι συχνά μικρότερη από 0,1 m, καθώς η διείσδυση του φωτός είναι δύσκολη σε μεγαλύτερους σωλήνες (Chisti Y., 2007). Οι στήλες φυσαλίδων αποτελούνται από μια μακρά στήλη που συνδέεται με μια δεξαμενή και η υγρή καλλιέργεια και ο αέρας κυκλοφορούν είτε προς την ίδια είτε προς αντίθετες κατευθύνσεις. Καθώς η αποτελεσματική επιφάνεια που εκτίθεται στο φως είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους σωληνοειδείς αντιδραστήρες, οι στήλες φυσαλίδων απαιτούν τεχνητό φωτισμό κατά μήκος τους για καλή παραγωγικότητα. Λόγω σχεδιαστικών περιορισμών, μόνο οι σωληνοειδείς αντιδραστήρες (τύπου σερπαντίνας) έχουν διαδοθεί ευρέως και χρησιμοποιούνται σε αποδοτική κλίμακα (Εικόνα 1.4.4, 1.4.5).



*Εικόνα 1.4.4.: Σχηματική αναπαράσταση σωληνοειδούς PBR ο οποίος κάνει χρήση ηλιακού φωτός.*



*Εικόνα 1.4.5.: Σωληνοειδής PBR ο οποίος κάνει χρήση ηλιακού φωτός.*

### 1.4.3. Υβριδικά συστήματα

Στα υβριδικά συστήματα, τόσο οι ανοικτές δεξαμενές όσο και οι κλειστοί βιοαντιδραστήρες χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων. Ο συνδυασμός και των δύο συστημάτων ενδέχεται να προσφέρει υψηλή απόδοση. Οι ανοικτές δεξαμενές

εμβολιάζονται με ένα επιθυμητό στέλεχος που καλλιεργείται πάντα σε βιοαντιδραστήρα. Σημαντικό είναι ότι το μέγεθος της ποσότητας του εμβολιασμού για τη νέα ανοικτή καλλιέργεια να είναι αρκετά μεγάλο, ώστε να καλλιεργηθεί το είδος που επιλέξαμε στο ανοικτό σύστημα πριν από ένα ανεπιθύμητο είδος. Επομένως, για να ελαχιστοποιηθούν τα ζητήματα μόλυνσης, ο καθαρισμός ή το ξέπλυμα των δεξαμενών πρέπει να αποτελεί μέρος της ρουτίνας της υδατοκαλλιέργειας και έτσι να μπορούν να θεωρηθούν ως καλλιέργειες παρτίδων. Αυτή η διαδικασία έχει καταδειχθεί από την Aquasearch (Χαβάη, ΗΠΑ) που καλλιεργεί *Haematococcus pluvialis* για την παραγωγή ασταξανθίνης (Schenk PM et al., 2008). Στον Πίνακα 1.4.1 απεικονίζεται μια συγκεντρωτική παρουσίαση και σύγκριση των ιδιοτήτων των μεθόδων καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας.

**Πίνακας 2.4.1:** Μια συγκεντρωτική παρουσίαση και σύγκριση των ιδιοτήτων των μεθόδων καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας (Brennan L. & Owende P., 2010).

Ιδιότητες	Ανοικτή καλλιέργεια με προπέλα	Βιοαντιδραστήρας ανάδευσης	Σωληνοειδής αντιδραστήρας	Αντιδραστήρες στήλης
Αποδοτικότητα φωτός	Αρκετά καλή	Αρκετά καλή	Πολύ καλή	Αρκετά καλή
Μεταφορά αέρα	Μέτρια	Χαμηλή-Υψηλή	Χαμηλή-Υψηλή	Υψηλή
Ανάδευση	Αρκετά ομοιόμορφη κατανομή	Σχεδόν πλήρης κατανομή	Πλήρης ομοιόμορφη κατανομή	Αρκετά ομοιόμορφη κατανομή
Έλεγχος ειδών	Κανένας	Πολύ καλός	Καλός	Καλός
Μειονεκτήματα	Μεγάλη περιοχή απαιτούμενης γης, χαμηλή παραγωγικότητα	Δύσκολη κλιμάκωση σε βιομηχανικό επίπεδο, υψηλό κόστος	Μόλυνση των σωλήνων ιδίως σε στροφές, δύσκολος καθαρισμός	Δύσκολη κλιμάκωση σε βιομηχανικό επίπεδο, υψηλό κόστος

## Κεφάλαιο 2: Βιοδραστικές ενώσεις μικροφυκών

### 2.1 Εισαγωγή

Τα μικροφύκη θεωρούνται δυνητική πηγή για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων λόγω της παρουσίας ενώσεων, όπως λιπαρά οξέα, χρωστικές ουσίες και άλλες βιοδραστικές ενώσεις (Parsaeimehr A. et al., 2015). Ωστόσο, η χαμηλή συγκέντρωση αυτών των ενώσεων στα αυτοφυή μικροφύκη και η δυσκολία απομόνωσής τους περιορίζει την παραγωγή τους, εξαιρουμένων κάποιων ενώσεων, όπως η ασταξανθίνη και το β-καροτένιο, τα οποία παράγονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Talero E. et al., 2015).

Η βιοχημική σύνθεση των μικροφυκών εξαρτάται από τα μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των μέσων καλλιέργειας. Τα θρεπτικά συστατικά συμμετέχουν στην ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών μέσω διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων για τη βιοσύνθεση διαφόρων ενώσεων (Karemore A. et al., 2013).

Η καλλιέργεια μικροφυκών αποτελεί τροφή για τον άνθρωπο και συμβάλλει σημαντικά στη μείωση του φαινομένου του θερμοκηπίου λόγω της ικανότητας των μικροφυκών να δεσμεύουν βιολογικά το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) (Wang B. et al., 2008). Ως εκ τούτου, η παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη είναι ενδιαφέρουσα, διότι μπορεί να αποτελέσει ένα μέσο βιώσιμης επεξεργασίας.

### 2.2. Χρωστικές ενώσεις

Αρκετά είδη μικροφυκών είναι γνωστό ότι είναι πλούσια σε έγχρωμα συστατικά υψηλής αξίας, για τα οποία πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες (Silva S. C. et al., 2020). Οι χρωστικές που συνδέονται με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα περιλαμβάνουν τη χλωροφύλλη, το β-καροτένιο, την ασταξανθίνη και τις φυκοκρωτεΐνες (Morochó-Jácome A.L. et al., 2020). Αυτές οι χρωστικές, όπως είναι οι πρόδρομες βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, ενισχυτές του ανοσοποιητικού συστήματος και αντιφλεγμονώδεις ουσίες, παρουσιάζουν ιδιότητες που προάγουν την υγεία (Christaki E. et al., 2015).

Οι συνθετικές χρωστικές ουσίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Ωστόσο, λόγω των προβλημάτων που συνδέονται με τις επιβλαβείς επιδράσεις αυτών των χρωστικών, η εκμετάλλευση των χρωστικών ουσιών μικροφυκών ως πηγή φυσικών χρωστικών ουσιών καθίσταται ελκυστική επιλογή. Παρόλα

αυτά, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, η αλατότητα, το pH, η θερμοκρασία, το μήκος κύματος του φωτός και η ένταση του φωτός που επηρεάζουν την παραγωγή χρωστικών ουσιών στα μικροφύκη (Begum H. et al., 2016).

Παρόλο που οι χρωστικές ουσίες που προέρχονται από μικροφύκη παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες για βιοτεχνολογικούς σκοπούς, η χρήση τους εξακολουθεί να αντιμετωπίζει μεγάλες προκλήσεις, όπως είναι το υψηλό κόστος παραγωγής και η αστάθεια των απομονωμένων ενώσεων (Pagels F. et al., 2020). Παρόλα αυτά, αρκετές μελέτες έχουν καταγράψει ελπιδοφόρες προοπτικές για τη χρήση των μικροφυκών ως πηγή χρωστικών ουσιών μέσω μιας βιώσιμης βιοδιαδικασίας. Η αυξημένη ζήτηση για φυσικές χρωστικές ουσίες από τους καταναλωτές και κατά συνέπεια από τη βιομηχανία ενθάρρυνε τη δημιουργία νέων πατεντών και τόνωσε την αγορά αυτών των ενώσεων, η οποία έχει "ανθίσει" τα τελευταία χρόνια (Silva S. C. et al., 2020).

Τα είδη μικροφυκών *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, η *Dunaliella salina* και *Haematococcus pluvialis* καλλιεργούνται σε μεγαλύτερη κλίμακα για αποξηραμένη βιομάζα και/ή την παραγωγή χρωστικών ουσιών (Hu J. et al., 2018). Τα είδη *Spirulina sp.* και *Chlorella sp.* κυριαρχούν στην αγορά μικροφυκών, καθώς χρησιμοποιούνται ως πηγή χρωστικών ουσιών, όπως οι φυκοπρωτεΐνες και τα καροτενοειδή (Sathasivam R. et al., 2018). Τα είδη *Dunaliella salina* και *Haematococcus pluvialis* παράγονται σε βιομηχανικό επίπεδο για την παραλαβή καροτενοειδών, ιδίως β-καροτένιο (πρόδρομη ουσία της βιταμίνης A) και ασταξανθίνης (ισχυρό αντιοξειδωτικό), αντίστοιχα (Da Silva Vaz B. et al., 2016).

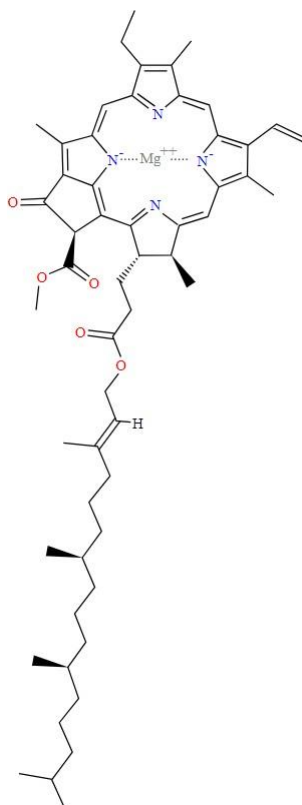
### 2.2.1. Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες είναι φωτοσυνθετικές πράσινες χρωστικές που βρίσκονται στα φύκη, στα βακτήρια και σε ανώτερα φυτά. Αποτελούν μια λιποδιαλυτή ένωση με ποικίλες βιοδραστικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική δράση (Lanfer-Marquez U.M. et al. 2005; Ferruzzi M.G. et al., 2002). Επιπλέον, η χρωστική αυτή απομονώνεται από τη βιομάζα μικροφυκών σε ποσοστό που κυμαίνεται από 0,5% έως 1,5% (βάση ξηρού βάρους). Οι χλωροφύλλες είναι τετραπυρόλες με κεντρικά συνδεδεμένο μαγνήσιο, οι οποίες λόγω του χρώματος και των βιολογικών ιδιοτήτων τους προσελκύουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Αυτή η φυσική πράσινη χρωστική ουσία βρίσκει εφαρμογές στους τομείς των τροφίμων, των καλλυντικών και των φαρμάκων (Koyande A.K. et al., 2019).

Αν και οι χλωροφύλλες αναγνωρίζονται ως φυσικές χρωστικές ουσίες, υπάρχουν μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση τους. Αυτή η χρωστική ουσία είναι χημικά

ασταθής σε συνθήκες pH και είναι ευαίσθητη στη θερμότητα και το φως (Silva S. C. et al., 2020). Ως εκ τούτου, οι χλωροφύλλες μετατρέπονται σε σταθερότερες παράγωγες ενώσεις, με κυριότερο εκπρόσωπο τη χλωροφυλλίνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο τροφίμων και χρωστική (Zhao W. et al., 2018).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι δομών χλωροφύλλης, όπως η χλωροφύλλη α (μπλε-πράσινο χρώμα) (Εικόνα 2.2.1.), β (λαμπερό πράσινο), γ (κίτρινο-πράσινο), δ (λαμπερό/πράσινο του δάσους) και στ (σμαραγδένιο πράσινο). Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο χλωροφύλλη α και β, ενώ οι χλωροφύλλες γ, δ και στ απαντώνται αποκλειστικά σε ορισμένα είδη μικροφυκών, φύκη και φωτοσυνθετικά βακτήρια (Queiroz Zepka L. et al., 2019).



**Εικόνα 2.2.1.** Απεικόνιση χημικής δομής α-χλωροφύλλης.

Η παραγωγή χλωροφύλλης από τα μικροφύκη μπορεί να διαμορφώνεται με την αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας (Encarnação et al., 2012), η οποία δεν εξαρτάται μόνο από το είδος, αλλά και από τον τρόπο καλλιέργειας (Carvalho A. P. et al., 2009). Οι συνθήκες φωτισμού της καλλιέργειας που ευνοούν ή εμποδίζουν τη συσσώρευση χλωροφύλλης σε διάφορα είδη μικροφυκών συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2.1..

**Πίνακας 2.2.1.** Η επίδραση των συνθηκών φωτισμού στην κυτταρική περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη διαφόρων ειδών μικροφυκών (da Silva Ferreira V. et al., 2017).

Είδη μικροφυκών	Συνθήκες φωτισμού	Επίδραση
<i>A. falcatus</i>	Βέλτιστος φωτισμός	Αύξηση της χλωροφύλλης α και β
<i>A. falcatus</i>	Απόλυτο σκοτάδι	Μείωση της χλωροφύλλης α και β
<i>C. reinhardtii</i>	Μειωμένη ένταση φωτός	Αύξηση της περιεκτικότητας σε ολική χλωροφύλλη
<i>Chlorella sp.</i>	Μειωμένη ένταση φωτός	Αύξηση της χλωροφύλλης α
<i>C. vulgaris</i>	Κόκκινος φωτισμός	Αύξηση της χλωροφύλλης α, β και γ
<i>M. dybowskii</i>	Μειωμένη ένταση φωτός	Αύξηση της χλωροφύλλης α
<i>P. lutheri</i>	Μειωμένη ένταση φωτός	Αύξηση της χλωροφύλλης α
<i>S. dimorphus</i>	Μειωμένη ένταση φωτός	Η συνολική χλωροφύλλη αυξήθηκε κατά 128%

Οι μεταβολές στην ένταση του προσπίπτοντος φωτός μεταβάλλουν την περιεκτικότητα των μικροφυκών σε χλωροφύλλη (da Silva Ferreira V. et al., 2017). Ο φωτοπεριοδικός κύκλος φωτός/σκοταδιού είναι επίσης σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού περιεχομένου χλωροφύλλης στα μικροφύκη. Ειδικότερα, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ενισχύθηκε μέσω της καλλιέργειας υπό κύκλους φωτός/σκοταδιού 12:12 ή 18:6 ωρών, σε σύγκριση τόσο με την καλλιέργεια υπό συνεχή φωτισμό (24:0 ώρες) όσο και με τους κύκλους 6:18 ωρών (da Silva Ferreira V. et al., 2017).

Τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σ' ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (Li WK, 1980). Σε ορισμένα είδη μικροφυκών, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη δεν τροποποιείται κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα διάφορα είδη απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες για τη βέλτιστη ανάπτυξη και συσσώρευση χλωροφύλλης (da Silva Ferreira V. et al., 2017).

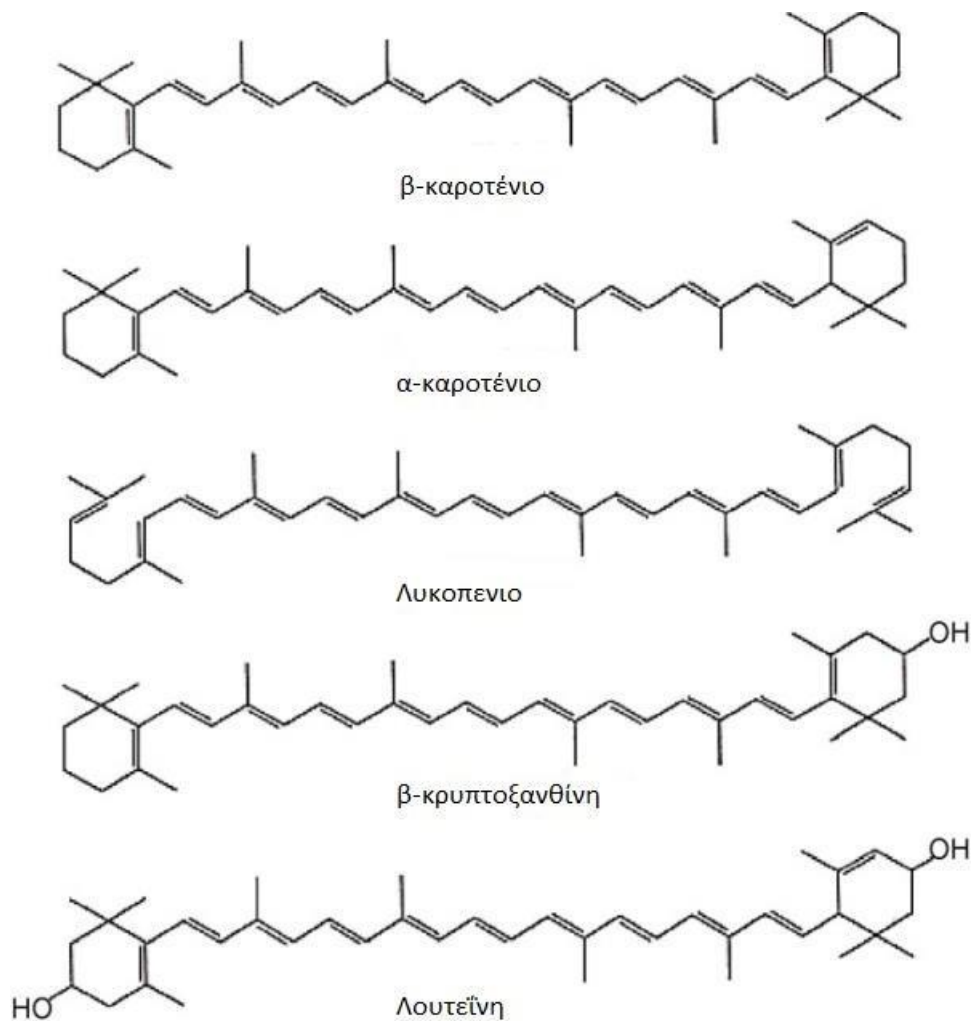
Το άζωτο είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τα μικροφύκη και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μορίων χλωροφύλλης (Lourenc,ο SO et al. 2004). Σε μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η έλλειψη αζώτου οδηγεί στη μείωση της



περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Επιπλέον, ο φωσφόρος αποτελεί ένα επιπλέον απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πλήθος διαδικασιών που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση, τη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης, γνωστή ως ATP, και τον κύκλο Calvin. Επομένως, η έλλειψή του επηρεάζει όχι μόνο τη σύνθεση της χλωροφύλλης αλλά και την κυτταρική ανάπτυξη και το μεταβολισμό (Liang K. et al. 2013). Σε περιπτώσεις που ο φωσφόρος είναι περιορισμένος, τα μικροφύκη δεν είναι ικανά να συνθέσουν ATP που είναι απαραίτητο για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης (Roopnarain A. et al., 2014).

### 2.2.2. β-καροτένιο

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια ευρέως διαδεδομένη ομάδα βιοδραστικών έγχρωμων ενώσεων τα οποία βρίσκονται κυρίως στα φυτά, αλλά και σε μικροφύκη και μικροοργανισμούς. Είναι λιποδιαλυτές ουσίες και έχουν πορτοκαλί – κόκκινο χρώμα. Αποτελούν μια ομάδα που διαθέτει περισσότερα από 600 φυσικά χρωστικά συστατικά. Ωστόσο, μόνο περίπου τα 40 είναι παρόντα σε μια τυπική ανθρώπινη διατροφή και από τα 40 μόλις τα 20 καροτενοειδή έχουν ταυτοποιηθεί στο ανθρώπινο σώμα και τους ιστούς. Τα καροτενοειδή διαίρονται σε δύο κατηγορίες, τα καροτένια (όπως το α-, β-καροτένιο και το λυκοπένιο) και τις ξανθοφύλλες (ασταξανθίνη, κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη, ζεανθανθίνη). Σχεδόν το 90% των καροτενοειδών στη διατροφή και στον ανθρώπινο οργανισμό αντιπροσωπεύεται από το β-καροτένιο, το α-καροτένιο, το λυκοπένιο, τη λουτεΐνη και την κρυπτοξανθίνη (Εικόνα 2.2.2.) (Silva S. C., 2020). Τα καροτενοειδή βρίσκουν εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Παραδείγματα είναι τα πρόσθετα χρωστικών τροφίμων (π.χ. β-καροτένιο (EC160)) και τα διατροφικά προϊόντα λόγω του ρόλου τους ως δραστικών συστατικών, τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και οι ζωοτροφές (π.χ. υδατοκαλλιέργεια σολομού). Εκτός αυτού, τα καροτενοειδή αναγνωρίζονται ως ισχυρά αντιοξειδωτικά και παρουσιάζουν λειτουργικές ιδιότητες που προάγουν την υγεία, όπως η μείωση των τριγλυκεριδίων και η αύξηση της χοληστερόλης HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) (Yoshida H. et al., 2010), καθώς και η πρόληψη του καρκίνου (Tanaka T. et al., 2012).



**Εικόνα 2.2.2.** Απεικόνιση χημικής δομής ορισμένων σημαντικών καροτενοειδών.

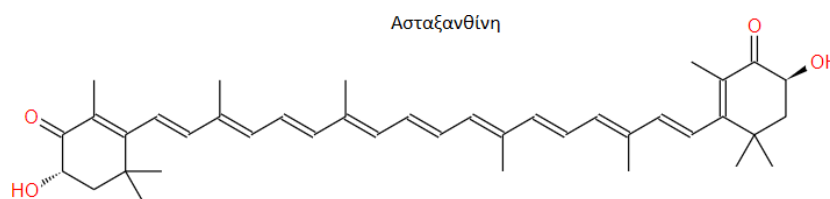
Το β-καροτένιο είναι το πιο σημαντικό καροτενοειδές. Το β-καροτένιο είναι μια προβιταμίνη Α και μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α (ρετινόλη), η οποία διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση των φυσιολογικών λειτουργιών στον οργανισμό των ζώων (Wang J. et al., 2022). Τα μικροφύκη συνθέτουν μια ποικιλία καροτενοειδών, συμπεριλαμβανομένου του β-καροτενίου, και αποτελούν πλούσια πηγή φυσικού β-καροτενίου. Αποθηκεύεται στα λιπιδικά σφαιρίδια που βρίσκονται στα μεσοθυλακοειδή διαστήματα του χλωροπλάστη (Ye Z.W. et al., 2008). Αυτή η χρωστική ουσία αναγνωρίζεται ως πρωτογενές καροτενοειδές. Εμπλέκεται άμεσα στη φωτοσύνθεση λόγω της δομής και των λειτουργικών ιδιοτήτων της στο φωτοσυνθετικό οργανισμό. Επί του παρόντος, το β-καροτένιο χρησιμοποιείται ευρέως ως φυσικός χρωστικός παράγοντας στη βιομηχανία τροφίμων (π.χ. αναψυκτικά, ψημένα τρόφιμα και μαργαρίνη), καθώς και ως ενεργό συστατικό σε αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής (Tinoco N.A.B. et al., 2015). Λόγω της απορρόφησης του φωτός, το β-καροτένιο

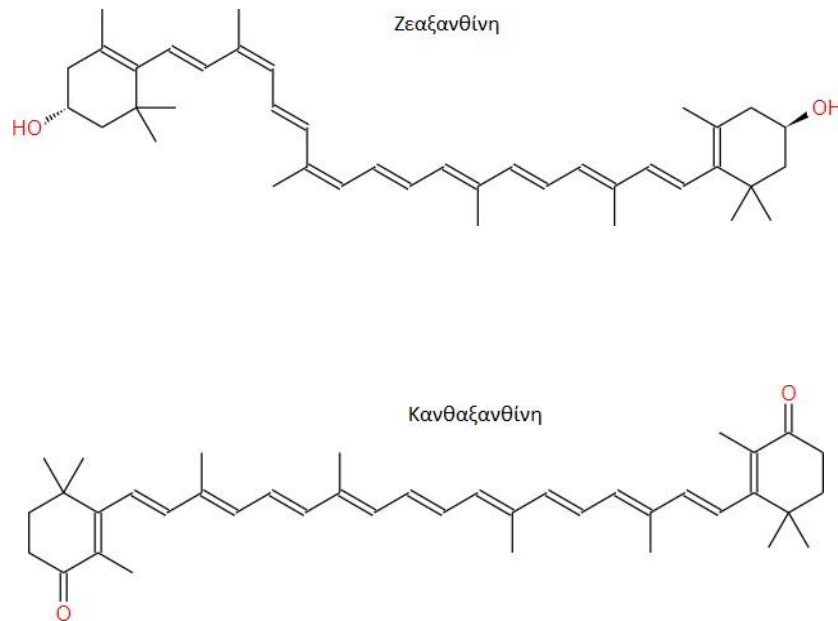
είναι υπεύθυνο για το χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την κόκκινη πιπεριά και το πορτοκάλι (Eroglu A. & Harrison E.H., 2013).

Το είδος *Dunaliella salina* είναι ένα ανθεκτικό μικροφύκος πράσινου χρώματος και αποτελεί την πλουσιότερη πηγή β-καροτενίου από μικροφύκη. Το *D. salina* συσσωρεύει υψηλή ποσότητα β-καροτενίου (έως και 10%, σε ξηρή βιομάζα) υπό δυσμενείς συνθήκες, όπως υψηλή αλατότητα, ένταση φωτός, ακραίες θερμοκρασίες ή/και έλλειψη θρεπτικών συστατικών (Ye Z.W. et al., 2008). Για την παραγωγή β-καροτενίου, η καλλιέργεια του είδους *D. salina* πραγματοποιείται μέσω ανάπτυξης στρατηγικής δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο είναι γνωστό ως "στάδιο πρασίνου", κατά το οποίο παρέχονται επαρκείς συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροφύκου *D. salina*. Εφόσον η συγκέντρωση των κυττάρων ανέλθει σ' ένα ορισμένο επίπεδο, εφαρμόζονται συνθήκες στρες για τη συσσώρευση περισσότερων καροτενοειδών, μετατρέποντας το χρώμα των μικροφυκών από πράσινο σε πορτοκαλί (φάση ερυθροποίησης) (Gong M. & Bassi A., 2016). Το β-καροτένιο που προέρχεται από *Dunaliella salina* έχει εγκριθεί ως χρωστική τροφίμων (E160 a (iv) Algal Carotenes) από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EU Commission, 2012).

### 2.2.3 Ασταξανθίνη

Η ασταξανθίνη (3,3'-διυδροξυ-β-καροτένιο-4,4'-διόνη) είναι μια λιποδιαλυτή πορτοκαλοκόκκινη χρωστική ουσία που ανήκει στην ομάδα των καροτενοειδών, όπως και το β-καροτένιο (βλ. ενότητα 2.2.2). Είναι ένα δευτερογενές καροτενοειδές που συντίθεται στον χλωροπλάστη, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και παράγεται από ορισμένα φυτά, φύκη και βακτήρια. Λόγω της τροφικής αλυσίδας δύναται ορισμένα ψάρια, οστρακόδερμα και πτηνά να αποτελούν πηγή ασταξανθίνης (Silva, S. C., et al., 2020). Η ασταξανθίνη θεωρείται το ισχυρότερο φυσικό αντιοξειδωτικό, με αντιοξειδωτική δράση 10 φορές ισχυρότερη από εκείνη άλλων καροτενοειδών, όπως η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, το β-καροτένιο και η κανθαξανθίνη (Εικόνα 2.2.3.) (Silva S. C., et al., 2020).





**Εικόνα 2.2.3.** Απεικόνιση χημικής δομής ασταξανθίνης, ζεαξανθίνης και κανθαξανθίνης.

Η ασταξανθίνη αποτελεί ένα υψηλής αξίας καροτενοειδές που παράγεται σήμερα είτε συνθετικά είτε μέσω εκχύλισης του μικροφύκου *Haematococcus pluvialis*. Άλλα μικροφύκη, όπως η *Chlorella zofingiensis*, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως πηγές ασταξανθίνης (Villaró S. et al., 2021). Οι διαφορές μεταξύ της συνθετικής και της φυσικής ασταξανθίνης εντοπίζονται όχι μόνο στην παραγωγική διαδικασία και στο κόστος, αλλά και στη χρήση και στη βιοδραστικότητα. Η ασταξανθίνη που προέρχεται από μικροφύκη χρησιμοποιείται ως χρωστική ουσία στην παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών ή υδατοτροφών και επιπλέον σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Villaró S. et al., 2021).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της συνθετικής ασταξανθίνης περιλαμβάνουν την υψηλή διαθεσιμότητα, το χαμηλότερο κόστος και τη μεγάλη διάρκεια ζωής, ενώ τα κύρια μειονεκτήματα περιλαμβάνουν τη χρήση πετροχημικών αντιδραστηρίων, τις αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και μια πολύπλοκη διαδρομή βιοσύνθεσης που δεν είναι βιώσιμη και ανανεώσιμη (Villaró S., et al., 2021).

Η φυσική ασταξανθίνη έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, είναι ασφαλέστερη και έχει μικρότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Villaró S. et al., 2021). Επιπλέον, η φυσική ασταξανθίνη επέδειξε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του χρωματισμού σε σχέση με τη συνθετική αντίστοιχη σε γαρίδες που τρέφονταν με διαφορετικές ποσότητες (25, 50, 75, 100 και 150 mg ασταξανθίνης ανά kg) κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής 8 εβδομάδων (Ju Z.Y. et al.,

2011). Όχι μόνο το χρώμα των εκτρεφόμενων θαλάσσιων ζώων αλλά και η ευεξία και η διατροφική τους ποιότητα βελτιώθηκαν έπειτα από την κατανάλωση μικροφυκών που περιέχουν ασταξανθίνη.

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί μία από τις πρώτες εφαρμογές της ασταξανθίνης και εφαρμόστηκε ως πρόσθετο ζωοτροφών για να προσδώσει το κόκκινο χρώμα στη σάρκα και στο κέλυφος του σολομού, της πέστροφας, των γαρίδων και των λαγκουσινών. Η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται, επίσης, σε συμπληρώματα διατροφής λόγω της θετικής δράσης της στην ανθρώπινη υγεία, όπως αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης και αντιγηραντική δράση (Hussein G. et al., 2006). Επιπλέον, είναι διαθέσιμη από χημικές πηγές (συνθετικά παραγόμενη) και από φυσικές πηγές (εκχυλισμένη από μικροφύκη, ζύμες κ.α.). Η συνθετική ασταξανθίνη διαθέτει 20 φορές χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τη φυσική μορφή και αντιστοιχεί στο 95% της ασταξανθίνης που διατίθεται στην αγορά. Μόνο η φυσική ασταξανθίνη έχει εγκριθεί για ανθρώπινη κατανάλωση από τον FDA (Rammuni, M.N. et al., 2019).

Το *Haematococcus pluvialis* είναι ένα μονοκύτταρο πράσινο μικροφύκος του γλυκού νερού που έχει τη δυνατότητα να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες ασταξανθίνης (έως και 3,8-5% του ξηρού βάρους του μικροφύκου). Αυτό το μικροφύκος χρησιμοποιείται συνήθως ως συστατικό διατροφικών και φαρμακευτικών προϊόντων, υδατοκαλλιεργείας, τροφίμων και καλλυντικών (Silva S. C. et al., 2020). Κατά αντιστοιχία με την παραγωγή β-καροτενίου από το *D. salina*, οι ίδιες απαιτήσεις οφείλουν να τηρούνται για την παραγωγή ασταξανθίνης από το *H. pluvialis*. Αυτά τα δύο μικροφύκη οφείλουν να βρίσκονται σε ακραίες συνθήκες για να παράγουν και να συσσωρεύουν χρωστικές (Fang N. et al., 2019). Σε συνθήκες στρες (π.χ. έλλειψη αζώτου και φωσφόρου, υψηλές ηλιακές εντάσεις/θερμοκρασίες και στρες αλατιού), η ασταξανθίνη συσσωρεύεται στα λιπιδικά σφαιρίδια του κυτταροπλάσματος των μικροφυκών (Rammuni M.N. et al., 2019).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε τη χρήση ελαιορητίνης πλούσιας σε ασταξανθίνη από *Haematococcus pluvialis* σε συμπληρώματα διατροφής σε μέγιστο επίπεδο 8 mg (ασταξανθίνη)/ημέρα (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2017), η οποία επιβεβαιώθηκε μέσα από δημοσίευμα επιστημονικής μελέτης από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) η ασφάλειά της ως νέο συστατικό τροφίμων.

#### 2.2.4 Φυκοπρωτεΐνες

Οι φυκοπρωτεΐνες (phycobiliproteins, PBPs) είναι πρωτεϊνικές χρωστικές που συλλέγουν το φως. Περιέχονται στα υπερμοριακά φυκοβιλιώματα στην εξωτερική επιφάνεια της θυλακοειδούς μεμβράνης και αντιστοιχούν στο 40-50% των συνολικών διαλυτών πρωτεϊνών. Πρόκειται για υδατοδιαλυτά μόρια που ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: φυκοκυανίνη (PC - μπλε χρωστική), αλλοφυκοκυανίνη (AP - γαλάζια χρωστική) και φυκοερυθρίνη (PE - κόκκινη χρωστική). Οι διαφορές μεταξύ τους είναι η χημική δομή, το χρώμα και τα φάσματα απορρόφησης. Χρησιμοποιούνται ως φθορίζοντες δείκτες και παρουσιάζουν λειτουργικές ιδιότητες (Manirafasha E. et al., 2016). Οι φυκοπρωτεΐνες μεγιστοποιούν την απορρόφηση του φωτός όταν εκτίθενται σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως αλλαγές στο pH ή στην ιοντική σύνθεση (Pagels F. et al., 2019). Έτσι, η δομή των φυκοπρωτεϊνών είναι πολύ σταθερή.

Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους που σχετίζονται με την απορρόφηση του φωτός, οι PBPs ταξινομούνται συνήθως σε τέσσερις διακριτές κατηγορίες: φυκοερυθρίνες (ροζ-μωβ-  $\lambda_{max}$  = 540-570 nm), φυκοερυθροκυανίνες (PECs- πορτοκαλί-  $\lambda_{max}$  = 560-600 nm), φυκοκυανίνες (μπλε-  $\lambda_{max}$  = 610-620 nm) και αλλοφυκοκυανίνες (μπλε-πράσινες-  $\lambda_{max}$  = 650-655 nm) (Tounsi L. et al., 2023). Οι PEs κατηγοριοποιούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες με βάση την προέλευσή τους και το φάσμα απορρόφησης τους: R-phycoerythrin (R-PE), B-phycoerythrin (B-PE) και C-phycoerythrin (C-PE). Κατά συνέπεια, τα προθέματα "B" και "R" αποδόθηκαν στα PBPs με βάση την ταξινομική προέλευση του οργανισμού από τον οποίο εξήχθησαν. Συγκεκριμένα, η ονομασία "R-PE" δόθηκε στις φυκοερυθρίνες που προέρχονται από τα *Rhodophyta*, ενώ η ονομασία "B-PE" χρησιμοποιήθηκε για εκείνες που ελήφθησαν από την τάξη *Bangiales* των *Rhodophyta* (Tounsi L. et al., 2023).

Το είδος *Spirulina (Arthrospira)* (φυκοκυανίνη) και το *Porphyridium sp.* (φυκοερυθρίνη) είναι οι δύο πιο γνωστές πηγές μικροφυκών για την εμπορική παραγωγή φυκοπρωτεϊνών (Dineshababu G. et al., 2019; Bhalamurugan G.L et al., 2018). Τα βιοδραστικά συστατικά της σπιρουλίνας είναι υψηλής διατροφικής αξίας και απομονώνονται με διάφορους τρόπους. Μεταξύ των βιοδραστικών ενώσεων της σπιρουλίνας, υπάρχει η φυσική μπλε χρωστική ουσία που ονομάζεται φυκοκυανίνη, η κύρια φυκοπρωτεΐνη του συγκεκριμένου μικροφύκου (De Morais M.G. et al., 2016). Η συγκεκριμένη χρωστική ουσία εγκρίθηκε να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο χρώματος από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων το 2013, ενώ επί του παρόντος χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική ουσία σε διάφορα προϊόντα, όπως ποτά και προϊόντα ζαχαροπλαστικής (Οργανισμός Τροφίμων και Ποτών,

2013). Επιπλέον, εφαρμόζεται στον φαρμακευτικό τομέα λόγω θεραπευτικών επιδράσεων (αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις) και στη βιομηχανία καλλυντικών (π.χ. κραγιόν και eyeliners) (Ilter, I et al., 2018).

Η φυκοκυανίνη παράγεται ήδη εμπορικά από το είδος *Spirulina platensis*, η οποία αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή της (έως και 25% της ξηρής βιομάζας, κ.β.) (Pan-utai W. et al., 2019). Για την παραγωγή φυκοκυανίνης χρησιμοποιούνται φωτοαυτότροφες καλλιέργειες του *S. platensis* που αναπτύσσονται σε ανοικτές καλλιέργειες. Αυτή η φωτοτροφική παραγωγή επηρεάζεται συνήθως από το φως (ένταση, πηγή και μήκος κύματος). Επιπλέον, το μέσο καλλιέργειας πρέπει να είναι κατάλληλο με σημαντική ποσότητα αλάτων (π.χ. ανθρακικά και διττανθρακικά) και αλκαλικότητα (pH 9,5 - 9,8) (Costa J.A.V. et al., 2019).

### 2.3. Υδατάνθρακες

Όπως έχει αναφερθεί, τα μικροφύκη αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για χρήση σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, διατροφικά σκευάσματα, φαρμακευτικά προϊόντα και άλλα βιομηχανικά προϊόντα υψηλής αξίας. Οι υδατάνθρακες σχηματίζονται στο εσωτερικό του χλωροπλάστη αλλά και στο κυτταρόλυμα. Τα *Porphyridium sp.*, *Chlorella sp.*, *Spirulina sp.* και *Nostoc sp.* είναι στελέχη που μελετώνται συχνά για την παραγωγή πολυσακχαριτών (Costa J.A.V et al., 2021).

Ένα από τα κύρια συστατικά της βιομάζας των φυκών είναι οι υδατάνθρακες των οποίων η συγκέντρωση εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας, τη σύνθεση των μέσων ανάπτυξης, την ένταση/διάρκεια φωτισμού και την παροχή CO<sub>2</sub> (Shahid A. et al., 2020). Η παραγωγή υδατανθράκων από μικροφύκη διερευνάται συνήθως για την παραγωγή βιοκαυσίμων με διαδοχική ζύμωση, αλλά μπορούν να προβλεφθούν και άλλες εφαρμογές σε βιοπολυμερή (Visca A. et al., 2017). Οι υδατάνθρακες των μικροφυκών είναι κυρίως με τη μορφή αμύλου και κυτταρίνης, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης και αποικοδομήσιμων βιοπλαστικών (Shahid A. et al., 2020). Επιπλέον, οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών, παρέχουν πολλές ενδιαφέρουσες πτυχές στον τομέα της επιστήμης των τροφίμων και της διατροφής ως βιώσιμη εναλλακτική λύση στην τεχνολογία τροφίμων (Gouda M. et al., 2022). Τέλος, παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και βιολογικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές δράσεις (Moreira J. B. et al., 2022).

Η παραγωγή υδατανθράκων εξυπηρετεί δύο κύριους σκοπούς για τα φύκη. Δρουν ως δομικά συστατικά στα κυτταρικά τοιχώματα και ως συστατικά αποθήκευσης στο εσωτερικό του

κυττάρου (Markou G. et al., 2012). Οι υδατάνθρακες, ως αποθηκευτικά συστατικά, παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για τις μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών και επιτρέπουν, αν χρειαστεί, την προσωρινή επιβίωση σε σκοτεινές συνθήκες (Raven JA & Beardall J., 2004). Γενικά, οι αποθηκευτικές ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες, επιτρέπουν στα μικροφύκη να προσαρμόζουν την ανάπτυξή τους στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Markou G. et al., 2012).

Οι υδατάνθρακες είναι μια ευρεία κατηγορία που περιλαμβάνει τα σάκχαρα (μονοσακχαρίτες) και τα πολυμερή τους (δι-, ολιγο- και πολυσακχαρίτες). Σε σύγκριση με άλλες πηγές, οι πολυσακχαρίτες που προέρχονται από μικροφύκη είναι ασφαλείς, βιοσυμβατοί, βιοδιασπώμενοι και σταθεροί (Moreira J. B. et al., 2022). Αυτά τα πολυμερή μακρομόρια παρουσιάζουν πολύπλοκες βιοχημικές δομές ανάλογα με κάθε είδος μικροφυκών. Για παράδειγμα, τα κυανοβακτήρια συνθέτουν γλυκογόνο, τα κόκκινα φύκη συνθέτουν άμυλο φλοριδίνη και τα πράσινα φύκη συνθέτουν πολυσακχαρίτες τύπου αμυλοπηκτίνης (Markou G. et al., 2012). Επιπλέον, η βιομάζα μικροφυκών δεν περιέχει ημικυτταρίνη και λιγνίνη, ενώ ορισμένα είδη δεν περιέχουν επίσης κυτταρίνη ή δεν διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα (Mussgnug JH. et al., 2010). Οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών αποτελούνται κυρίως από γαλακτόζη, ξυλόζη και γλυκόζη. Μπορεί επίσης να υπάρχουν και άλλα σάκχαρα, καθώς και υπολείμματα γλυκουρονικού και γαλακτουρονικού οξέος (Costa J.A.V et al., 2021). Στον Πίνακα 2.3.1. παρατίθενται ορισμένοι υδατάνθρακες μικροφυκών:

**Πίνακας 2.3.1.** Υδατάνθρακες σε επιλεγμένα είδη μικροφυκών (Markou G. et al., 2012).

	Μικροφύκη					
	<i>Chlorocccum</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Nitzchia</i>	<i>Phaeoda</i>	<i>Dunaliella</i>
<b>Σάκχαρα</b> *	<i>sp.</i>	<i>platensis</i>	<i>reinhardtii</i>	<i>ciosterium</i>	<i>ctylum</i> <i>tnicornutum</i>	<i>tertiolecta</i>
<b>Ξυλόζη</b> (%)	27	7.0	-	7.0	7.5	1.0
<b>Μαννόζη</b> (%)	15	9.3	2.3	16.8	45.9	4.5
<b>Γλυκόζη</b> (%)	47	54.4	74.9	32.6	21.0	85.3



<b>Γαλακτόζη (%)</b>	9	-	4.5	18.4	8.9	1.1
<b>Ραμνόζη (%)</b>	-	22.3	1.5	7.7	8.6	5.5

(\*Τα σάκχαρα εκφράζονται ως ποσοστό των συνολικών υδατανθράκων.)

Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες εκτός από το είδος των μικροφυκών εξαρτάται και από τις συνθήκες καλλιέργειας και το περιβάλλον. Ο έλεγχος ορισμένων από τις συνθήκες καλλιέργειας ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες φαίνεται να είναι μια προσιτή προσέγγιση για τον χειρισμό της σύνθεσης της βιομάζας των μικροφυκών, προκειμένου να αυξηθεί ή να μειωτοποιηθεί η συσσώρευση υδατανθράκων. Οι πιο συχνά αναφερόμενοι καλλιεργητικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, είναι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η αλατότητα, η ένταση του φωτός και η θερμοκρασία (Markou G. et al., 2012). Επίσης, ο μεταβολικός τρόπος (αυτότροφος, ετερότροφος και μιζότροφος) επηρεάζει τη σύνθεση της βιομάζας.

Οι υδατάνθρακες με βάση τα μικροφύκη απαιτούν λιγότερη επεξεργασία από άλλες πηγές, δεδομένου ότι είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικοί για πολλές εφαρμογές (Chen C.Y. et al., 2013). Οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών έχουν πλεονεκτήματα έναντι άλλων πηγών πολυσακχαριτών (χερσαία φυτά, καρκινοειδή, στυλό καλαμαριού ή κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων), όπως η ασφάλεια, η σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα, που συμβάλλουν στην προώθηση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων σε διάφορα προϊόντα (Patel A.K. et al., 2022).

Οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών έχουν βιολογικές ιδιότητες που ποικίλλουν ανάλογα με τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η β-γλυκάνη, η οποία διαθέτει τη γλυκόζη ως δομικό συστατικό με β-1,3- ή β-1,4-γραμμικούς δεσμούς που συνδέονται με β-1,6 δεσμούς, παρουσιάζει δράση ως διαιτητική ίνα, ενώ η μορφή β-1,4 δεν διαθέτει ανοσοτροποποιητική επιδράση (Villarruel-López A. et al., 2017). Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την εφαρμογή πολυσακχαριτών και παραγώγων τους από μικροφύκη ως διαιτητικές ίνες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον ως μια νέα πρεβιοτική πηγή για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων (Gouda M. et al., 2022). Επιπλέον, λόγω του υψηλού ιξώδους των πολυσακχαριτών μικροφυκών σε ένα ευρύ φάσμα pH, θερμοκρασίας και αλατότητας, τα μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων ως πηκτικά και πρόσθετα τροφίμων (Venugopal V. et al., 2016).

Οι πολυσακχαρίτες μικροφυκών είναι επίσης πολλά υποσχόμενοι για την ανάπτυξη συσκευασιών τροφίμων, επειδή είναι βιοδιασπώμενοι και βιώσιμοι. Εκτός από τη γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα και την αντιμυκητησιακή τους ιδιότητα, οι πολυσακχαρίτες από τρία είδη μικροφυκών (*Nostoc sp.*, *Synechocystis sp.* και *Porphyridium purpureum*) έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού βιοφίλμ (διαφανές, εύκαμπτο, τραχύ με πόρους και σχισμές) (Morales-Jiménez M. et al., 2020).

Η χρήση των μικροφυκών ως πηγή πολυσακχαριτών για εφαρμογές σε λειτουργικά τρόφιμα, διατροφικά φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

#### 2.4. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που βρίσκονται σε αφθονία σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελούν σημαντικό διατροφικό συστατικό για τον άνθρωπο. Με σημερινό παγκόσμιο πληθυσμό 7,3 δισεκατομμυρίων, η ζήτηση πρωτεϊνών ανέρχεται ήδη σε 202 εκατομμύρια τόνους (MT) ετησίως και προβλέπεται να αυξηθεί σε 360-1250 MT έως το 2050 (Soto-Sierra L. et al., 2018). Η δυνατότητα κάλυψης της μελλοντικής ζήτησης πρωτεϊνών μόνο μέσω της αύξησης της παραγωγής ζωικών και φυτικών προϊόντων είναι μη ρεαλιστική λόγω της επίσης αυξανόμενης ζήτησης για ζωοτροφές και γεωργική γη (Henchion M. et al., 2017). Συνεπώς, απαιτούνται εναλλακτικές πηγές διαιτητικής πρωτεΐνης για την κάλυψη των προβλεπόμενων διατροφικών αναγκών (Εικόνα 2.4.1).

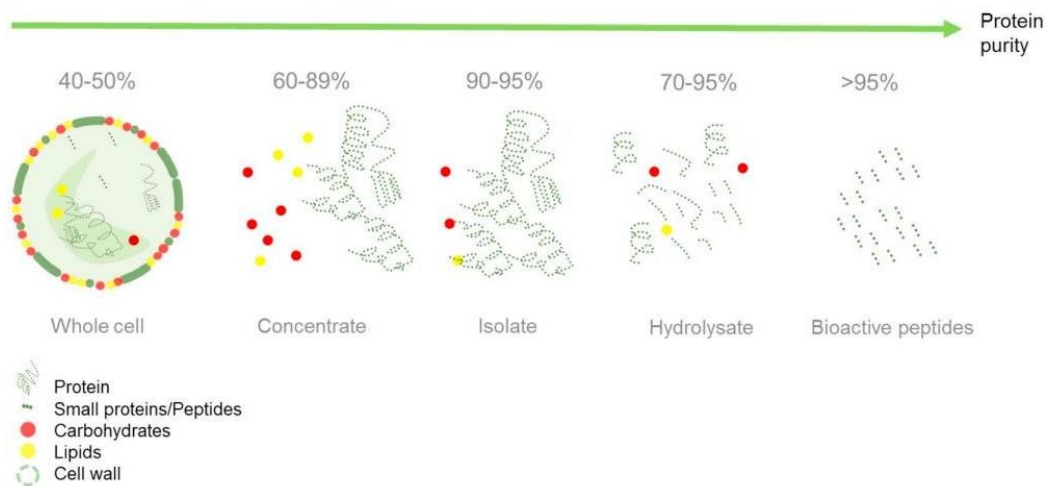


**Εικόνα 2.4.1.** Οι 5 πιο δημοφιλείς πηγές εναλλακτικών πρωτεϊνών.

Οι προτεινόμενες εναλλακτικές πηγές είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν βακτήρια, έντομα και μικροφύκη. Τα μικροφύκη αναγνωρίζονται ως μια εναλλακτική πηγή υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες που μπορεί να καλύψει τις απαιτήσεις του υποσιτισμένου πληθυσμού (Christaki E. et al., 2011). Η υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (~50%), οι ευνοϊκές διατροφικές ιδιότητες και η χαμηλή πιθανότητα εμφάνισης αλλεργιών των πρωτεϊνικών προϊόντων που προέρχονται από μικροφύκη έχουν ως αποτέλεσμα να πλεονεκτούν έναντι κοινών πηγών πρωτεΐνης, όπως η σόγια (37% DW πρωτεΐνη), το γάλα (26% DW πρωτεΐνη), το κρέας (43% DW πρωτεΐνη) και η μαγιά (39% DW πρωτεΐνη) (Wells M.L. et al., 2017). Οι τρέχουσες τάσεις του τρόπου ζωής, όπως η αυξημένη κατανάλωση vegan τροφίμων και διατροφικών προϊόντων που προάγουν την υγεία, έχουν φέρει τα μικροφύκη στο προσκήνιο των μη ζωικών πηγών πρωτεΐνης.

Τα μικροφύκη αποτελούν πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε λειτουργικά, διατροφικά και θεραπευτικά σκευάσματα (Soto-Sierra L. et al., 2018). Η κατανάλωση μικροφυκών ως συμπλήρωμα διατροφής πραγματοποιείται μέσω χαπιών, δισκίων, σκόνης ή πάστας (Koyande, A. K. Et al., 2019). Επίσης, τα τελευταία χρόνια πρωτεΐνες προερχόμενες από μικροφύκη έχουν ενσωματωθεί σε μπισκότα, γλυκά, ψωμί, ζυμαρικά, ποτά και μπίρα (Koyande, A. K. Et al., 2019). Ενώ η βελτιστοποίηση και η ενσωμάτωση αυτών σε προϊόντα που εξακολουθούν να απαιτούνται για την επέκταση των εμπορικών εφαρμογών, έχουν γίνει διάφορες προσεγγίσεις για την επεξεργασία και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών προϊόντων που προέρχονται από μικροφύκη, όπως συμπυκνώματα πρωτεϊνών, υδρόλυτα και βιοενεργά πεπτίδια (Soto-Sierra L. et al., 2018).

Τα σημερινά πρωτεϊνικά προϊόντα που μπορούν να παραχθούν από μικροφύκη μπορούν να ταξινομηθούν, με βάση την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και τον βαθμό εξευγενισμού, ως πρωτεΐνες ολόκληρων κυττάρων, συμπυκνώματα πρωτεϊνών, απομονωμένα, υδρόλυτα και βιοδραστικά πεπτίδια (Εικόνα 2.4.2.). Η πρωτεΐνη ολόκληρων κυττάρων μικροφυκών περιέχει περίπου 40-50% πρωτεΐνη, αλλά τα ποσοστά ποικίλλουν ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες ανάπτυξης. Για να ληφθούν συμπυκνωμένα πρωτεϊνικά προϊόντα (60-89% πρωτεΐνη DW), όπως συμπυκνώματα πρωτεϊνών, απομονωμένα, υδρολυμένα και βιοδραστικά πεπτίδια, η πρωτεΐνη από κύτταρα μικροφυκών θα πρέπει να εκχυλίζεται και να συμπυκνώνεται (Soto-Sierra L. et al., 2018).



**Εικόνα 2.4.2.** Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών προϊόντων που προέρχονται από μικροφύκη με βάση την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες (Soto-Sierra L. et al., 2018).

Ορισμένα μικροφύκη παρουσιάζουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δύο φορές υψηλότερη από τις συμβατικές πηγές πρωτεϊνών (Amorim, M. L et al., 2021). Οι πρωτεΐνες των μικροφυκών απαντώνται σε διάφορα μέρη του κυττάρου, όπως στο κυτταρόπλασμα, στα οργανίδια, στα πλαστίδια, στο κυτταρικό τοίχωμα και στον πυρήνα (Safi et al. 2015). Ωστόσο, τα μικροφύκη παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση του αριθμού των πιθανών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε γονιδιώματά τους (Amorim, M. L et al., 2021). Είναι ενδιαφέρον ότι ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες δεν συσχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (Amorim, M. L et al., 2021).

Μια σημαντική πρωτεΐνη στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι η καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης-οξυγόνου (Rubisco). Η πρωτεΐνη αυτή είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στη δέσμευση ανόργανου άνθρακα κατά τη φωτοσύνθεση και βρίσκεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται πυρενοειδές στους χλωροπλάστες των μικροφυκών (Kuchitsu, Tsuzuki & Miyachi, 1988). Επιπλέον, η Rubisco έχει προταθεί ως δυνητική πηγή πρωτεΐνης για τη διατροφή και ως λειτουργικό συστατικό και παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε διάφορα μικροφύκη (Di Stefano et al., 2018). Επιπλέον, ένα ακόμα παράδειγμα μικροφυκών που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε μία πρωτεΐνη είναι το *A. platensis* που παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα στην πρωτεΐνη C-φυκοκυανίνη. Αυτή η φυκοπρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του φωτός και παρουσιάζει εφαρμογές στα τρόφιμα, την ιατρική και στη βιοτεχνολογία (Eriksen N. T., 2008).

Η πρωτεϊνική παραγωγικότητα των μικροφυκών μπορεί να βελτιωθεί με την υιοθέτηση συγκεκριμένων μεθόδων καλλιέργειας, ενώ υπάρχουν αρκετές παράμετροι που μπορούν να

ρυθμίσουν την παραγωγή πρωτεϊνών αλλά θα πρέπει να προσαρμόζονται για κάθε στέλεχος μικροφυκών (Rocha D. N. et al., 2019). Ωστόσο, τα μικροφύκη παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες όταν καλλιεργούνται σε συνθήκες μη στρες, ενώ διάφορες συνθήκες όπως η αλατότητα και η έλλειψη θρεπτικών προκαλούν τη συσσώρευση μορίων πλούσιων σε άνθρακα, όπως τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες συστατικών (Danesh, A. F. et al. 2017; Rocha D. N. et al., 2019). Η πιο σημαντική παράμετρος για την παραγωγή υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες σε καλλιέργειες μικροφυκών είναι το άζωτο (Perez-Garcia, O. et al., 2011).

Άλλοι σημαντικοί παράμετροι για την αύξηση της πρωτεϊνικής παραγωγικότητας στα μικροφύκη είναι η ποιότητα και η ένταση του φωτός, τα θρεπτικά συστατικά, η θερμοκρασία, η αλατότητα, η παροχή και η πηγή άνθρακα και οι κλιματικές συνθήκες (Amorim, M. L et al., 2021). Τα θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του CO<sub>2</sub>, πρέπει να προσαρμόζονται σύμφωνα με τις διατροφικές απαιτήσεις του στελέχους μικροφυκών, συνήθως 1,8 kg CO<sub>2</sub> ανά kg βιομάζας ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία για την καλλιέργεια μικροφυκών ποικίλλει ανάλογα με το είδος, αλλά συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20 °C και 25 °C (Ras, M., Steyer J.-P, & Bernard O., 2013). Επομένως, ορισμένες περιοχές ενδέχεται να απαιτούν τη χρήση ανθεκτικών στελεχών που είναι σε θέση να παρουσιάζουν υψηλή παραγωγικότητα πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια διαστημάτων που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες.

Μια σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών είναι ο προσδιορισμός του προφίλ των αμινοξέων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα απαραίτητα αμινοξέα, επειδή δεν παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως λαμβάνονται με τη διατροφή. Τα απαραίτητα αμινοξέα είναι η ισολευκίνη, η λευκίνη, η βαλίνη, η λυσίνη, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη, η μεθειονίνη, η κυστεΐνη, η τρυπτοφάνη, η θρεονίνη και η ιστιδίνη. Η περιεκτικότητα σε αμινοξέα σε ορισμένα μικροφύκη έχει βρεθεί ότι είναι συγκρίσιμη με εκείνη των πηγών υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Απαραίτητα αμινοξέα βρέθηκε ότι υπάρχουν στα μικροφύκη σε ποσότητες που είναι συγκρίσιμες ή μεγαλύτερες σε σύγκριση με πηγές πλούσιες σε πρωτεΐνες όπως τα αυγά και σόγια. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO/WHO, 2007) πρότεινε ένα πρότυπο αναφοράς με τη συνιστώμενη περιεκτικότητα των απαραίτητων αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη ή ένα μείγμα πρωτεϊνών (Πίνακας 2.4.1.).

**Πίνακας 2.4.1.** Προφίλ αμινοξέων διαφόρων πρωτεϊνών από μικροφύκη και πρωτεϊνών από διάφορες πηγές που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, εκτός από το πρότυπο που συνιστάται από τον FAO ( $g \cdot 100 g^{-1}$  πρωτεΐνης).

Πηγή	Ile*	Leu*	Val*	Lys*	Phe+Tyr*	Met+Cys*	Trp*	Thr*	His*
<b>FAO/WHO</b>	4	7	5	5.5	6	3.5	1	-	-
<b>Αυγό</b>	6.6	8.8	7.2	5.3	10	5.5	1.7	5	2.4
<b>Σόγια</b>	5.3	7.7	5.3	6.4	8.7	3.2	1.4	4	2.6
<b>Καλαμπόκι</b>	3.4	11.2	4.9	3.2	8.9	3.3	4.4	3.7	-
<b>C. vulgaris</b>	3.8	8.8	5.5	8.4	8.4	3.6	2.1	4.8	2
<b>D. bardawil</b>	4.2	11	5.8	7	9.5	3.5	0.7	5.4	1.8
<b>S. obliquus</b>	3.6	7.3	6	5.6	8	2.1	0.3	5.1	2.1
<b>A. maxima</b>	6	8	6.5	4.6	8.8	1.8	1.4	4.6	1.8
<b>A. platensis</b>	6.7	9.8	7.1	4.8	10.6	3.4	0.3	6.2	2.2
<b>Aphanizomenon sp.</b>	2.9	5.2	3.2	3.5	2.5	0.9	0.7	3.2	0.9

\* Ile, ισολευκίνη- Leu, λευκίνη- Val, βαλίνη- Lis, λυσίνη- Phe, φαινυλαλανίνη- Tyr, τυροσίνη- Met, μεθειονίνη- Cys, κυστεΐνη- Trp, τρυπτοφάνη- Thr, θρεονίνη- His, ιστιδίνη. Τα αμινοξέα που δεν παράγονται από τον άνθρωπο (απαραίτητα αμινοξέα), είναι απαραίτητα να αποκτηθούν μέσω της διατροφής.

Τα προφίλ αμινοξέων του αυγού και της σόγιας έδειξαν επαρκή περιεκτικότητα για όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, ενώ το κυανοβακτήριο *Aphanizomenon sp.* έδειξε χαμηλή περιεκτικότητα αυτών των αμινοξέων. Τα προφίλ αμινοξέων των *C. vulgaris* και *Dunaliella bardawil* παρουσίαζαν ελαφρά ανεπάρκεια σε ισολευκίνη και τρυπτοφάνη, αντίστοιχα, ενώ τα *S. obliquus*, *A. maxima* και *A. platensis* παρουσίαζαν ανεπάρκεια σε δύο ή τρία απαραίτητα αμινοξέα. Τα μικροφύκη παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ αμινοξέων όταν καλλιεργούνται υπό διαφορετικές συνθήκες, επομένως η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας μικροφυκών μπορεί να επιτρέψει την παραγωγή πρωτεϊνών με το κατάλληλο προφίλ αμινοξέων (Amorim, M. L et al., 2021).

Τα είδη *Chlorella* και *Spirulina* αποτελούνται περίπου από 70% πρωτεΐνες σε σχέση με τη μάζα τους (Bleakley S. & Hayes M., 2017). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), τα μικροφύκη όπως η *Chlorella sp.* και *Spirulina sp.* περιέχουν μια ισορροπημένη περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται για ανθρώπινη κατανάλωση (Koyande, A. K. et al., 2019).

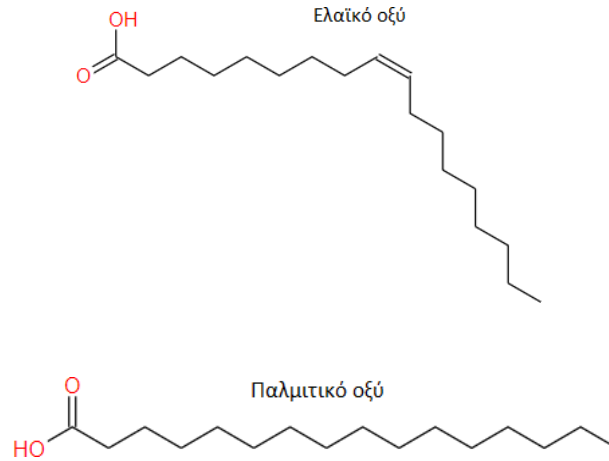
## 2.5. Λιπίδια

Τα μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων, παράγουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων δομικών και βιοδραστικών λιπιδίων με διάφορους ρόλους στο μεταβολισμό του κυττάρου και πιθανές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία (Manning, S. R., 2022). Έρευνες των τελευταίων 50 ετών έχουν εξετάσει τα μικροφύκη ως προς την παραγωγή λιπιδίων για υγρά βιοκαύσιμα, ενώ έχουν διερευνηθεί οι δυνατότητες των μικροφυκών λιπιδίων στη χρήση τους ως συμπληρώματα διατροφής και φαρμακευτικά προϊόντα (Barkia I. et al., 2019).

Τα μικροφύκη έχουν τεράστιες δυνατότητες ως μονοκύτταρα “βιολογικά εργοστάσια” για την παραγωγή μη πολικών και πολικών λιπιδίων με πιθανές εφαρμογές σε τρόφιμα, καύσιμα και περιβάλλον (Mathimani T. & Rugazhendhi A., 2019). Τα μη πολικά λιπίδια είναι ενώσεις με βάση τους υδρογονάνθρακες που δεν αλληλεπιδρούν εύκολα με το νερό όπως είναι οι κήροι, τα τερπενοειδή, τα γλυκερολιπίδια, τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγά τους. Από την άλλη, τα πολικά λιπίδια περιέχουν περισσότερο οξυγόνο και φορτισμένες πλευρικές ομάδες, επιτρέποντας μέτριες αλληλεπιδράσεις με το νερό, όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια (Manning, S. R. 2022).

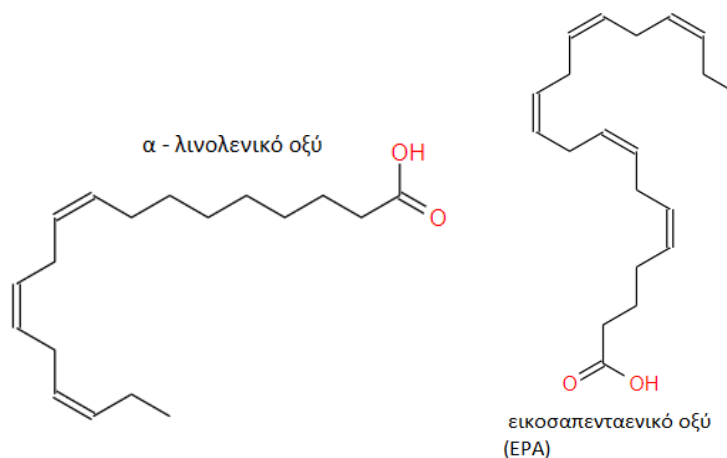
### 2.5.1. Λιπαρά οξέα

Η ζήτηση για βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον πηγές τροφίμων και συστατικά τροφίμων αυξάνεται και τα μικροφύκη προωθούνται ως βιώσιμη πηγή απαραίτητων και βιοδραστικών λιπιδίων, με υψηλά επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων, συγκρίσιμα με εκείνα των ψαριών (Conde T. A. et al., 2021). Επιπλέον, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς το προφίλ και την αφθονία των λιπαρών οξέων (Fatty Acid, FA), γεγονός που δείχνει αξιοποιήσιμες δυνατότητες (Maltsev, Y. & Maltseva, K. 2021). Πράγματι, στα μικροφύκη περιεγράφηκαν διαφορετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA). Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα κοινά λιπαρά οξέα που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών μικροφυκών, όπως για παράδειγμα το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το ελαϊκό οξύ (C18:1) (Εικόνα 2.5.1.) (Conde, T. A. et al., 2021).



**Εικόνα 2.5.1.** Απεικόνιση χημικής δομής του ελαϊκού και παλμιτικού οξέος.

Ορισμένα μικροφύκη είναι πλούσια σε ωμέγα-3 ( $\omega$ -3) λιπαρά οξέα και συχνά θεωρούνται ως οι κύριοι παραγωγοί αυτών των υγιεινών λιπιδίων, αποτελώντας μια εναλλακτική πηγή έναντι των ιχθυρών (Adarme-Vega, T.C. et al., 2012). Επίσης, ανάλογα με το είδος του μικροφύκου, μπορούν να παρέχουν απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3  $\omega$ -3; ALA) (Εικόνα 2.5.2.) (Innis, S.M, 2014). Ορισμένα μικροφύκη παρέχουν, επίσης, εικοσαπενταενικό οξύ (EPA) και αποτελούν άμεση πηγή αυτού του βιοδραστικού λιπαρού οξέος (Εικόνα 2.5.2.) (Krupanidhi, S. & Sanjeevi, C.B., 2007). Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς το EPA δεν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στα χερσαία φυτά, αλλά βρίσκεται σε ορισμένα φύκη, όπως το *Palmaria palmata*, αλλά σε χαμηλότερες ποσότητες σε σύγκριση με τα μικροφύκη (Krupanidhi, S. & Sanjeevi, C.B., 2007).



**Εικόνα 2.5.2.** Απεικόνιση μοριακής δομής του  $\alpha$ -λινολενικού και εικοσαπενταενικού οξέων.



Οι σύγχρονες διατροφές συχνά παρουσιάζουν ανισορροπία στην πρόσληψη των απαραίτητων λιπαρών οξέων (Melo, H.M. et al., 2019). Τα μικροφύκη θεωρούνται σημαντικά νέα τρόφιμα για την πρόληψη της παγκόσμιας επιβάρυνσης από τις χρόνιες ασθένειες του 21ου αιώνα και ως εκ τούτου θα πρέπει να συμπεριληφθούν στις υγιεινές διατροφές (Koyande, A.K. et al., 2019). Η σύσταση για την πρόσληψη μικροφυκών υποστηρίζεται επίσης από τη βιώσιμη παραγωγή τους στην υδατοκαλλιέργεια, καθώς δεν έχουν ανταγωνιστική δράση στο νερό ή στη γη και, κατά συνέπεια, δεν ανταγωνίζονται άλλα χερσαία φυτά, μειώνοντας, έτσι, τη ρύπανση των ωκεανών και την υπερεκμετάλλευση των θαλάσσιων πόρων (Khan, M.I. et al., 2018). Τα μειονεκτήματα της κατανάλωσης ιχθυελαίων, όπως τα σημαντικά επίπεδα συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων ή αντιβιοτικών στα ιχθυέλαια, ενισχύουν επίσης τα μικροφύκη ως πολλά υποσχόμενη πηγή υγιεινών λιπιδίων (Charles, C.N. et al., 2019).

Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ω-3 λιπαρών οξέων στα μικροφύκη είναι απαραίτητη για την αξιοποίησή τους ως τρόφιμα και συστατικά τροφίμων (Remize, M. et al., 2021). Τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι ευαίσθητα στην οξείδωση και, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως συντηρητικά τροφίμων για την πρόληψη της αλλοίωσης (Ismail, A. et al., 2016).

Με την πάροδο των ετών, πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα μικροφύκη έχουν διαφορετικά προφίλ λιπαρών οξέων, ορισμένα από τα οποία θεωρούνται σημαντικά για την εκμετάλλευση των μικροφυκών και τη διατροφική αξιοποίηση, καθώς και για την ταξινόμησή τους (Jeong, E.-Y. et al., 2011). Πράγματι, έχει ήδη αναφερθεί ότι το επίπεδο παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων και τα είδη λιπαρών οξέων διαφέρουν μεταξύ των μικροφυκών. Για παράδειγμα, η ταξινομική βαθμίδα των Διατόμων και των Ευστιγματοφύτων, όπως το *Phaeodactylum tricornutum* και το *Nannochloropsis sp.*, αντίστοιχα, είναι σημαντικοί συνθέτες της EPA, ενώ τα μικροφύκη που ανήκουν στις τάξεις των Δινοφύτων, των Απτοφύτων και των Θραυστοφύτων θεωρούνται παραγωγοί της DHA- (Peltomaa, E. Et al., 2019). Η παραγωγή μακράς αλυσίδας ω-3 λιπαρών οξέων (EPA και DHA) στα κυανοβακτήρια (π.χ. *Spirulina platensis*) και στα χλωροφύκη (π.χ. *Chlorella vulgaris*) θεωρείται αμελητέα και, στην περίπτωση της *C. vulgaris*, εντοπίζονται μόνο ενδιαφέρουσες ποσότητες ALA ή στεαριδονικού οξέος (C18:4 ω-3) (Tairale, S. et al., 2020). Παρόλο που ορισμένα μικροφύκη παράγουν χαμηλότερα επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων, οι ποσότητες αυτές μπορούν να αυξηθούν με παρεμβάσεις στις συνθήκες καλλιέργειας, καθώς η παραγωγή τους εξαρτάται και από το περιβάλλον (Gladyshev, M.I. & Sushchik, N.N. et al., 2019).

### 2.5.2 Κήροι

Οι κήροι των φύκων περιλαμβάνουν αλκάνια μακράς αλυσίδας, λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες και εστέρες λιπαρών οξέων και λιπαρών αλκοολών για την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Niklas KJ et al., 2017). Αν και δομικά παρόμοιοι, οι κήροι που εξάγονται από το *Klebsormidium flaccidum* (Charophyta) και το *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) είναι χημικά μοναδικοί σε σύγκριση με τους κήρους από χερσαία φυτά (Kondo S. et al., 2016). Συνεπώς, η σύνθεση των κήρων μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ομάδων φυκών και η αφθονία των διαφόρων ενώσεων εξαρτάται πιθανώς από την καλλιέργεια χαρακτηριστικά (Manning, S. R. 2022).

### 2.5.3. Τερπενοειδή

Τα μικροφύκη παράγουν ένα ευρύ φάσμα τερπενοειδών, συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών, των στερολών και των συναφών ισοπρενοειδών (Manning, S. R. 2022). Τα καροτένια είναι τετρατερπενικοί υδρογονάνθρακες, όπως για παράδειγμα το λυκοπένιο και το β-καροτένιο ενώ οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονωμένα καροτενοειδή που μπορεί να διαθέτουν εστέρες λιπαρών οξέων, όπως για παράδειγμα η φουκοξανθίνη, η λουτεΐνη, η ασταξανθίνη. Αυτές οι χρωστικές παίζουν σημαντικό ρόλο στη συλλογή του φωτός καθώς και στη φωτοπροστασία (Gurta AK et al., 2021).

Οι στερόλες είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα και τη ρευστότητα των μεμβρανών (Hannan MA et al., 2020). Η φουκοστερόλη είναι άφθονη στα πράσινα, κόκκινα και καφέ φύκη και πολλά στελέχη έχουν ελεγχθεί για τη δυνατότητά τους να παράγουν στερόλες (Randhir A. et al., 2020). Οι φυλογενετικές αναλύσεις αποκάλυψαν διαφορές στη σύνθεση στερολών μεταξύ μυκήτων, φυτών και φυκών (Manning, S. R. 2022).

### 2.5.4. Γλυκερολιπίδια

Τα γλυκερολιπίδια είναι εστέρες γλυκερόλης με 13 κατάλοιπα λιπαρών οξέων που περιλαμβάνουν μονοακυλογλυκερόλες (MAG), διακυλογλυκερόλες (DAG) και τριακυλογλυκερόλες (TAG), επίσης γνωστά ως ουδέτερα λιπίδια. Οι TAG αποτελούν τις πρωταρχικές ενώσεις αποθήκευσης ενέργειας στα κύτταρα και ο μεταβολισμός τους είναι ιδιαίτερα δυναμικός και έχει αποδειχθεί ότι τα λιπιδικά σώματα αυξάνονται υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, όπως για παράδειγμα το φως που επηρεάζει την παραγωγή TAG (Manning, S. R. 2022).

Έχει διαπιστωθεί ότι η *Chlorella vulgaris* και η *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) μοιράζονται συντηρημένα βιοσυνθετικά μονοπάτια που οδήγησαν στην αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης, στη σύνθεση γλυκερολιπιδίων και υδρόφοβων φραγμών ως αντίδραση στην ένταση του φωτός (Manning, S. R. 2022).

#### 2.5.5. Γλυκολιπίδια

Τα γλυκολιπίδια είναι τα κύρια συστατικά των θυλακοειδών μεμβρανών στα κυανοβακτήρια και στους χλωροπλάστες των ευκαρυωτικών μικροφυκών. Τα γλυκολιπίδια είναι εστέρες γλυκερόλης που διαθέτουν διάφορα κατάλοιπα λιπαρών οξέων και γαλακτοσυλίων (Li-Beisson Y. et al., 2019). Τα δύο κύρια συστατικά των θυλακοειδών μεμβρανών περιλαμβάνουν τα μονογαλακτοσυλδιακυλογλυκερίδια (MGDG) και τα διγαλακτοσυλδιακυλογλυκερίδια (DGDG) (Manning, S. R. 2022).

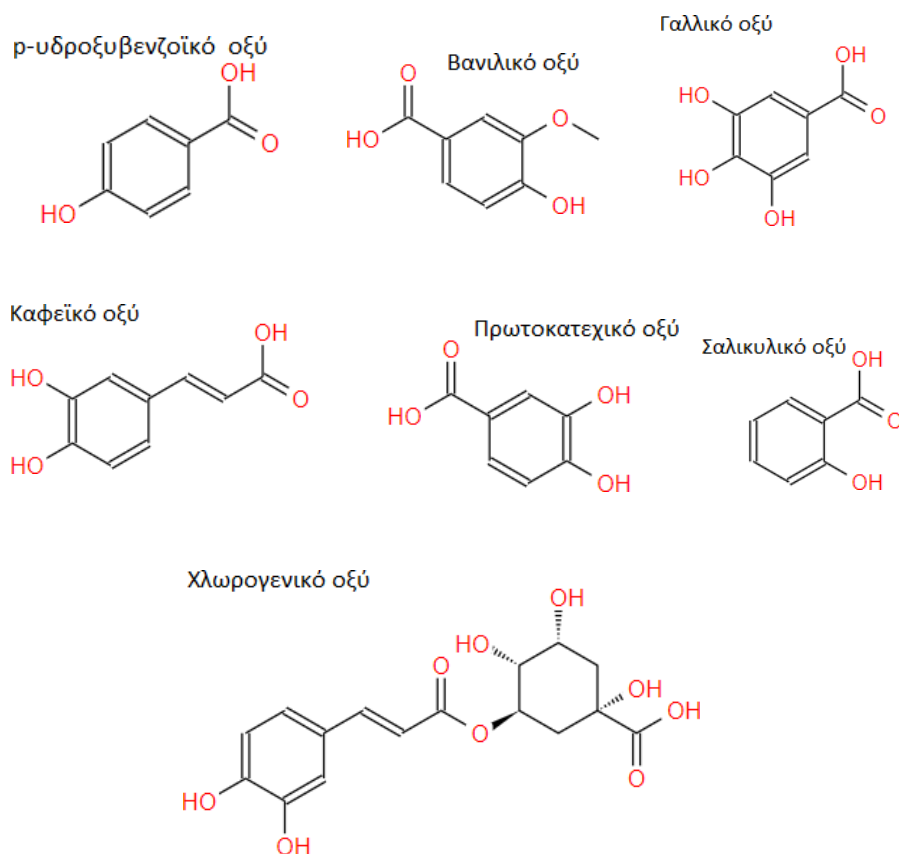
#### 2.5.6. Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια (phospholipids, PL) είναι το πιο κοινό στοιχείο των κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων. Τα PL είναι εστέρες γλυκερόλης με 12 κατάλοιπα λιπαρών οξέων και μια φωσφορική ομάδα συνδεδεμένη με ένα κατάλοιπο αμίνης ή/και σακχάρου. Αυτά τα λιπίδια προσανατολίζουν την πολική κεφαλή γλυκερόλης προς τη διεπιφάνεια νερού και συγκεντρώνονται για να σχηματίσουν λιπιδικές διπλοστιβάδες (Li-Beisson Y. et al., 2019). Τα μικροφύκη παράγουν μια σειρά φωσφολιπιδίων με μεταβλητά κατάλοιπα λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και της φωσφατιδυλολινοσιτόλης (PI) (Manning, S. R. 2022). Η αφθονία και η κατανομή της PL, σε συνδυασμό με τις στερόλες και τις πρωτεΐνες, συμβάλλουν στη λειτουργία της μεμβράνης και σταθερότητα (Manning, S. R. 2022).

### 2.6. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών με αναγνωρισμένες βιολογικές δράσεις που τις καθιστούν ελκυστικές στη βιοτεχνολογία. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες στα φυτά επιτρέποντας στον οργανισμό να αλληλοεπιδρά και να προσαρμόζεται στο περιβάλλον του και να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία. Τα φύκη αποτελούν φυσικές πηγές αυτών των μορίων. Αρκετές κατηγορίες φλαβονοειδών, όπως οι φλαβονόλες, οι φλαβονόνες, οι ισοφλαβόνες και οι διυδροχαλκόνες, βρέθηκαν σε μικροφύκη και κυανοβακτήρια. Επιπλέον, φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό (gallic acid), το πρωτοκατεχικό (protocatechuic

acid), το καφεϊκό (caffeic acid), το χλωρογενικό (chlorogenic acid), το βανιλικό (vanillic acid), το p-υδροξυβενζοϊκό (p-hydroxybenzoic acid) και το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid), βρέθηκαν σε διάφορα είδη θαλάσσιων φυκών (Εικόνα 2.6.1) (Goiris, K. et al., 2015). Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στα κύτταρα των φυκών ποικίλλει ανάλογα με την εποχή, τον βióτοπο και διάφορους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, το φως, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και η αλατότητα (Freile-Pelegriń, Y. & Robledo, D. 2013).

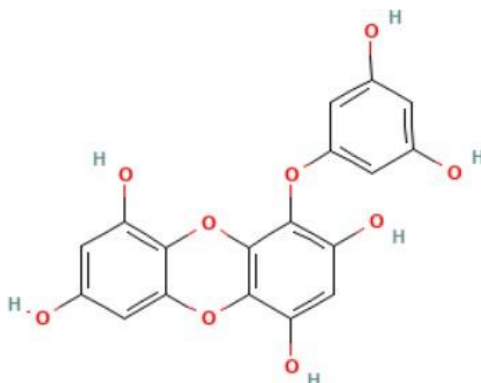


**Εικόνα 2.6.1.** Απεικόνιση χημικής δομής των: γαλλικό οξύ (*gallic acid*), πρωτοκατεχικό οξύ (*protocatechuic acid*), καφεϊκό οξύ (*caffeic acid*), χλωρογενικό οξύ (*chlorogenic acid*), βανιλικό οξύ (*vanillic acid*), p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (*p-hydroxybenzoic acid*) και σαλικυλικό οξύ (*salicylic acid*)

Η δομή των φαινολικών ενώσεων κυμαίνεται από απλούς αρωματικούς δακτυλίους (φαινόλες) έως πιο σύνθετα μόρια (πολυφαινόλες). Η αξιοσημείωτη χημική τους ποικιλομορφία ταιριάζει με την πληθώρα λειτουργιών που εμφανίζουν στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, συμμετέχοντας, για παράδειγμα, σε μηχανισμούς άμυνας ή στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (Naikoo MI et al., 2019). Οι περισσότερες από τις φαινολικές ενώσεις είναι γνωστές για τις βιοδραστικές τους ιδιότητες (Perera D. et al., 2016), καθώς είναι ικανές να ρυθμίζουν το οξειδωτικό και φλεγμονώδες στρες, να ρυθμίζουν την

πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών και να ασκούν πρεβιοτικές επιδράσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο (Santangelo R. Et al., 2019).

Οι φαινολικές ενώσεις των μικροφυκών έχουν διερευνηθεί λιγότερο σε σχέση με άλλα συστατικά. Αν και μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1980, η παρουσία των φαινολικών ενώσεων στα φύκη ήταν αντικείμενο συζήτησης, σήμερα τα φύκη θεωρούνται πλούσια πηγή φαινολικών και το ενδιαφέρον στον τομέα αυτό αυξάνεται (Mekinic IG. et al., 2019). Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες μελέτες αφορούν τα φύκη, ενώ τα μικροφύκη έχουν διερευνηθεί λιγότερο (Del Mondo A. et al., 2021). Η πλειονότητα της βιβλιογραφίας σχετικά με τα φαινολικά συστατικά μικροφυκών επικεντρώνεται στην περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ή/και ολικά φλαβονοειδή, ενώ υπάρχει μια πρόσφατη αύξηση μελετών σχετική με την απομόνωση μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων και τον έλεγχο των ιδιοτήτων τους (Smerilli A. et al., 2019). Πράγματι, ορισμένες μελέτες αποκάλυψαν βιοτεχνολογικά σημαντικές φαινολικές ενώσεις μικροφυκών, που περιλαμβάνουν ασυνήθιστες ενώσεις, όπως οι φλωροτανίνες (Εικόνα 2.6.2.) (Al-Mola HF, 2009) και η μαρενίνη (Gastineau R. et al., 2014).



**Εικόνα 2.6.2.** Απεικόνιση χημικής δομής φλωροτανίνης.

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν ευεργετικά χαρακτηριστικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής καλλυντικών, φαρμάκων και τροφίμων. Οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές επιδράσεις τους είναι μερικές από τις βιοδραστικότητες που έχουν μελετηθεί περισσότερο (Jimenez-Lopez, C. et al., 2021). Έχει αποδειχθεί ότι τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από μικροφύκη διαθέτουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Goiris, K. et al., 2012). Η μελέτη των Goiris et al. έδειξε ότι συνδυαστικά με τα καροτενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις συνέβαλαν σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων μικροφυκών. Πιο συγκεκριμένα, 32 δείγματα βιομάζας μικροφυκών ελέγχθηκαν για την αντιοξειδωτική τους

ικανότητα με τη χρήση τριών αντιοξειδωτικών δοκιμών και μετρήθηκαν τόσο η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά όσο και σε καροτενοειδή. Τα μικροφύκη εκχυλίστηκαν με εκχύλιση ενός σταδίου με αιθανόλη/νερό ή εναλλακτικά με διαδικασία κλασματοποίησης τριών σταδίων με διαδοχική χρήση εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα και νερού. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων διέφερε έντονα μεταξύ των ειδών και εξαρτιόταν περαιτέρω από τις συνθήκες ανάπτυξης και τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση. Διαπιστώθηκε ότι τα βιομηχανικά καλλιεργούμενα δείγματα των *Tetraselmis suecica*, *Botryococcus braunii*, *Neochloris oleoabundans*, *Isochrysis sp.*, *Chlorella vulgaris* και *Phaeodactylum tricornutum* διέθεταν τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές ικανότητες σε αυτή τη μελέτη και συνεπώς θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια πιθανή νέα πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών.

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από φύκια, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία της νόσου του Alzheimer. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, λαμβάνοντας υπόψη ότι μία από τις προτεινόμενες αιτίες της νόσου Αλτσχάιμερ είναι η συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών που προκαλούνται από παραγώμενα είδη οξυγόνου. Επιπλέον, οι Gabr κ.ά. (Gabr, G.A et al., 2022) απέδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις που απομονώνονται από την *Spirulina platensis* μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά του οξειδωτικού στρες και της ηπατικής βλάβης σε διαβητικούς αρουραίους.

Αν και οι πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων των μικροφυκών είναι περιορισμένες και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις φαινόλες σε αυτούς τους μικροοργανισμούς, ορισμένες ομάδες φυκών (χλωροφύκη, ροδοφύκη και κυανοβακτήρια) έχουν ερευνηθεί περισσότερο από άλλες (π.χ. διάτομα, απόφυτα) (Del Mondo A. et al., 2021). Ενώ, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φαινολικά συστατικά των μικροφυκών αποδεικνύεται από την όλο και πιο εμπλουτισμένη επιστημονική βιβλιογραφία με την πάροδο του χρόνου, η έλλειψη εμπεριστατωμένων πληροφοριών αποτελεί περιορισμό για τα ερευνητικά έργα στον τομέα αυτό καθώς υπάρχει κενό στην κατανόησή της σε σύγκριση με την καλά μελετημένη βιοσύνθεση των φαινολικών ουσιών εντός των ανώτερων φυτών. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με το θέμα αυτό μπορούν να ανοίξουν το δρόμο για τη διαμόρφωση φυσικών λειτουργικών ή υγιεινών τροφίμων.

## Κεφάλαιο 3: Εκχύλιση και χαρακτηρισμός βιοδραστικών ενώσεων μικροφυκών

### 3.1 Μέθοδοι εκχύλισης

Οι μέθοδοι εκχύλισης αναφέρονται στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση συγκεκριμένων ενώσεων ή συστατικών από ένα μείγμα ή μήτρα. Αυτές οι μέθοδοι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους, συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της βιοχημείας και της φαρμακολογίας. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις εκχυλίσεις των μικροφυκών απορροφώνται από το κυτταρικό τοίχωμα στο εσωτερικό του κυττάρου και προκαλούν διόγκωση και ρήξη των μικροφυκών, καθιστώντας το περιεχόμενο του κυττάρου διαθέσιμο προς διαχωρισμό στα επόμενα στάδια της εκχύλισης (Molina Grima E. et al., 2013). Οι κύριες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή διαλύτη για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη είναι η πολικότητα, η λιποδιαλυτότητα, η αναμειξιμότητα νερού (ικανότητα για διφασικά συστήματα) και η χαμηλή τοξικότητα (Bensalem S. et al., 2018).

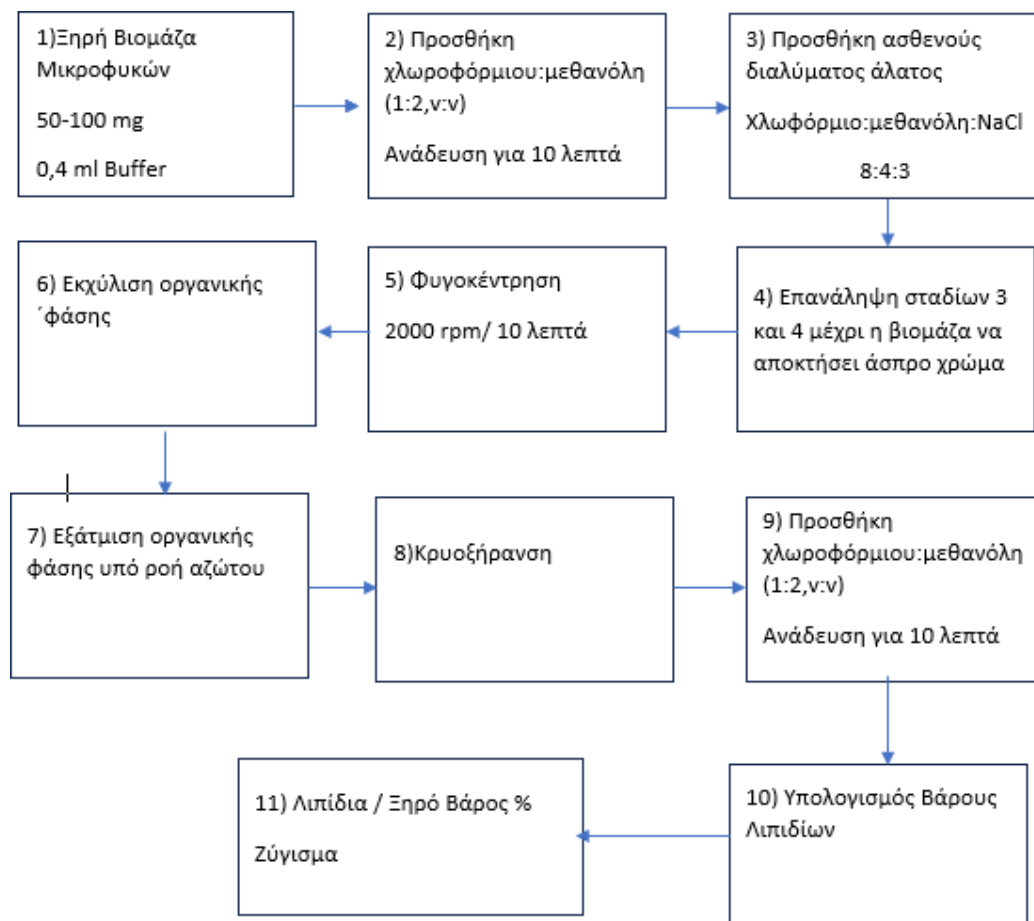
Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν να διακριθούν σε συμβατικές και σε προηγμένες τεχνικές. Στις συμβατικές συγκαταλέγονται η εκχύλιση Soxhlet, η Folch, η μέθοδος Bligh και Dyer, η λυοφιλίωση και οι μηχανικές μέθοδοι. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και προηγμένες τεχνικές εκχύλισης, όπως η τεχνολογία εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού, η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων, οι τεχνολογίες παλμικού ηλεκτρικού πεδίου και οι υπέρηχοι. Η τάση που υπάρχει για μεγαλύτερη περιβαλλοντική ασφάλεια, αυξημένα ζητήματα βιωσιμότητας και αυξανόμενη έμφαση στην αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τεχνικών που προωθούν τη μείωση των οργανικών διαλυτών, τη χρήση ενζύμων και της οσμωτικής πίεσης.

#### 3.1.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης (conventional extraction methods)

##### 3.1.1.1. Μέθοδος Folch

Η εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Folch βασίζεται στη χρήση χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 στο μίγμα για εκχύλιση ενδοκυτταρικών λιπιδίων και αποτελεί τη βάση πολλών μεθόδων εκχύλισης που χρησιμοποιούνται σήμερα. Πρώτον, ένα ομογενοποιημένο κύτταρο εξισορροπείται με 25% κατ' όγκο αλατούχου διαλύματος με ταυτόχρονη ανάδευση.

Ακολουθεί ο διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος όπου τα λιπίδια συγκεντρώνονται στο ανώτερο στρώμα (Ranjith Kumar R. et al., 2015). Έπειτα, η οργανική φάση ανακτάται και εξατμίζεται υπό ροή αζώτου. Τα λιπίδια ζυγίζονται και η περιεκτικότητα σε λιπίδια υπολογίζεται ως η αναλογία του βάρους των λιπιδίων προς το βάρος της ολικής βιομάζας μικροφυκών (Διάγραμμα 3.1.1.).



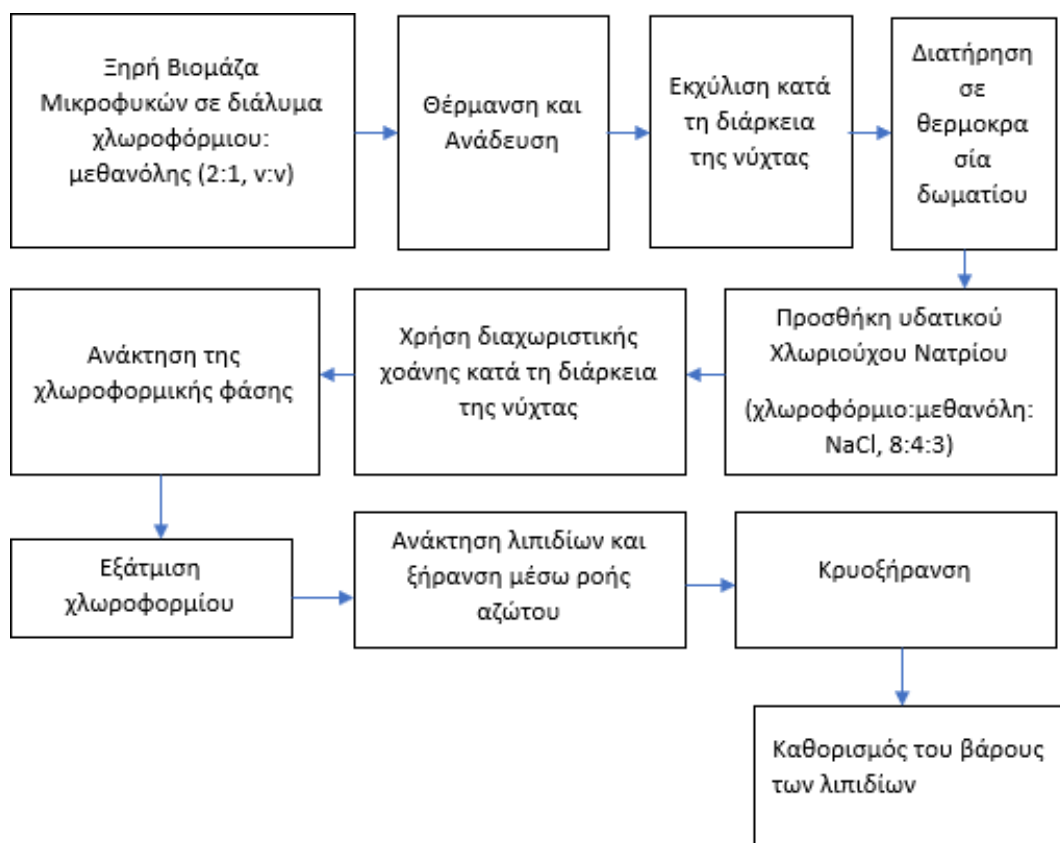
**Διάγραμμα 3.1.1.** Σχήμα τροποποιημένης μεθόδου Folch για την εκχύλιση λιπιδίων από κύτταρα μικροφυκών (Salinas-Salazar C. et.al, 2019).

### 3.1.1.2. Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet (SE) είναι μια διαδικασία κατά την οποία μερικώς διαλυτά συστατικά ενός στερεού δείγματος μεταφέρονται σε υγρή φάση (διαλύτης). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο. Η εκχύλιση ξεκινάει (Διάγραμμα 3.1.2.) με την τοποθέτηση του στερεού δείγματος σε διηθητικό χαρτί στον κύριο θάλαμο της συσκευής Soxhlet. Στη συνέχεια, ο διαλύτης θερμαίνεται και μεταφέρεται στον κύριο θάλαμο, έτσι ώστε οι λιγότερο διαλυτές ενώσεις να ανακτώνται από τον διαλύτη. Όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη της εκχύλισης τόσο υψηλότερη απόδοση στην εκχύλιση μικροφυκών



επιτυγχάνεται μέσω της ανάκτησης σύνθετων λιπιδίων και χρωστικών ουσιών (Baumgardt FJL et al., 2016). Αυτό είναι σημαντικό δεδομένου ότι τα ολικά εκχυλίσματα λιπιδίων με πολικούς διαλύτες είναι πολύπλοκα καθώς υπάρχουν και άλλοι μεταβολίτες διαφορετικοί από τα λιπίδια.

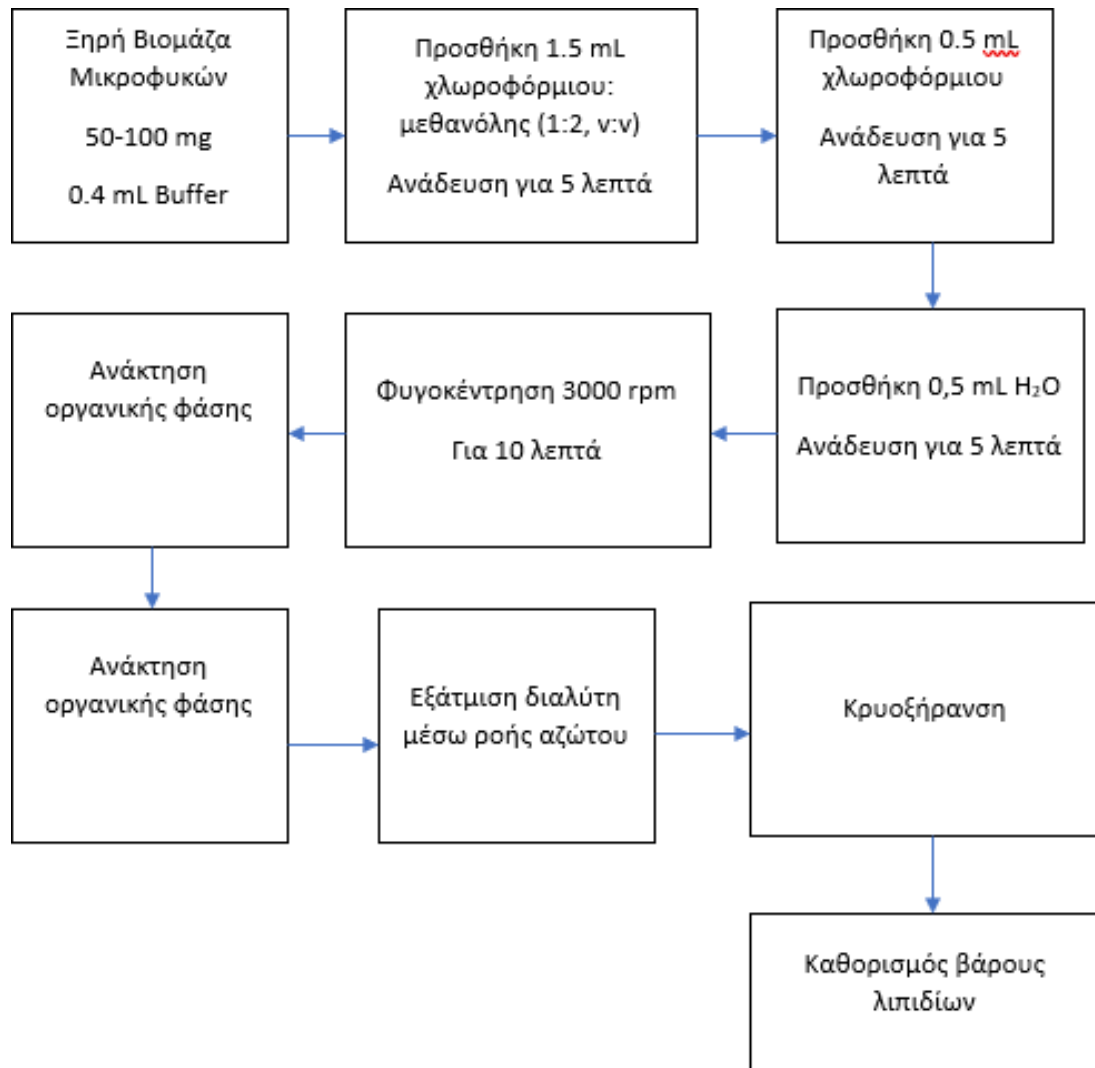


**Διάγραμμα 3.1.2.** Διάγραμμα της μεθόδου εκχύλισης Soxhlet για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη (C.Salinas-Salazar et.al, 2019).

Οι παράμετροι εκχύλισης Soxhlet περιλαμβάνουν την επιλογή διαλύτη, το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος και το χρόνο εκχύλισης (Sharif KM et al., 2014). Η εκχύλιση Soxhlet πραγματοποιείται συνήθως σε εργαστηριακή κλίμακα και απαιτεί υψηλή κατανάλωση διαλύτη και μεγάλο χρόνο εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι ολικοί μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) μετρώνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας εκχύλισης (Baumgardt FJL et al., 2016).

### 3.1.1.3. Η μέθοδος Bligh και Dyer

Η μέθοδος Bligh και Dyer βασίζεται στην ταυτόχρονη εκχύλιση λιπιδίων και την κατανομή με καθίζηση των πρωτεϊνών στη διεπαφή μεταξύ των δύο υγρών φάσεων, παρόμοια με τη μέθοδο Folch. Ωστόσο, η σύνθεση και οι αναλογίες του μείγματος διαλυτών είναι διαφορετικές (Διάγραμμα 3.1.3.). Πρώτα, τα λιπίδια από ένα ομογενοποιημένο κύτταρο εξάγονται με χλωροφόρμιο-μεθανόλη 1:2 και ανακτάται η χλωροφορμική φάση (πλούσια σε λιπίδια). Τα λιπίδια των μικροφυκών εκχυλίζονται και μετρώνται με σταθμική μέθοδο. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται σε πιλοτικές διαδικασίες και επιχειρήσεις μεγάλης κλίμακας (Kumar R. et al., 2015). Μια βελτίωση αυτής της μεθόδου είναι η προσθήκη χλωριούχου νατρίου 1 M (NaCl), αντί νερού, προκειμένου να αποφευχθεί η δέσμευση όξινων λιπιδίων σε μετουσιωμένα λιπίδια. Μικρότεροι χρόνοι διαχωρισμού έχουν επιτευχθεί με την προσθήκη 0,2 M φωσφορικού οξέος και υδροχλωρικού HCl. Αύξηση της ανάκτησης των όξινων φωσφολιπιδίων έχει επιτευχθεί με την προσθήκη 0,5% οξικού οξέος (v/v) (Kumar R. et al., 2015). Η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη παραμένει ως μία από τις κύριες στρατηγικές για την ανάκτηση πολύτιμων προϊόντων από μικροφύκη. Οι διαλύτες θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την πολικότητα των ενώσεων-στόχων.



**Διάγραμμα 3.1.3.** Διάγραμμα της μεθόδου Bligh-Dyer για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη (C.Salinas-Salazar et al, 2019).

#### 3.1.1.4. Μηχανικές μέθοδοι

##### 3.1.1.4.1. Άλεσμα

Βασίζεται στη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροφυκών με λείανση και ανάδευση των κυττάρων σε μια συμπαγή επιφάνεια γυάλινων σφαιριδίων (Ghasemi Naghdi F. et al., 2016). Το μέγεθος από τα σφαιρίδια για αποτελεσματική διάρρηξη κυμαίνεται από 0,3-0,5 mm. Οι σφαίρες κατασκευάζονται από διοξείδιο του πυριτίου-ζirkονίου ή οξείδιο του ζirkονίου. Η αποδοτικότητα της διεργασίας καθορίζεται από τη συγκέντρωση βιομάζας, τον ρυθμό ροής, τον τύπο κίνησης και την ταχύτητα κίνησης του αναδευτήρα και τη θερμοκρασία. Η διαδικασία της άλεσης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανακινούμενα δοχεία

ή μέσω σφαιριδίων. Στη μέθοδο του ανακινούμενου δοχείου, το δοχείο καλλιέργειας ανακινείται με δόνηση, επιτρέποντας στα σφαιρίδια να κινούν τα κύτταρα των μικροφυκών αναγκάζοντάς τα να συγκρούονται μεταξύ τους. Η ανάκτηση λιπιδίων μέσω αυτής της μεθόδου μπορεί να φτάσει στο 40% των λιπιδίων από μια καλλιέργεια του *Phaeodactylum tricronutum* (Ryckebosch E. et.al., 2012).

#### 3.1.1.4.2. Άσκηση πίεσης

Η χρήση πιεστηρίων είναι μία από τις κλασικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή προϊόντων από πολλές πηγές. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη μηχανική σύνθλιψη υλικών με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Πρώτα απ' όλα, η αποξηραμένη βιομάζα υποβάλλεται σε υψηλή μηχανική πίεση για να πραγματοποιηθεί σύνθλιψη και θραύση των κυττάρων και στη συνέχεια συμπίεση ώστε να εκχυλιστούν οι ουσίες. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μπορεί να βελτιωθεί με διακυμάνσεις της χρησιμοποιούμενης πίεσης, του χρησιμοποιούμενου στελέχους φυκών και της διαμόρφωσης του πιεστηρίου. Στην εναλλακτική λύση πηκτής-πρέσας, τα φύκη εκπλένονται πρώτα πριν την εκχύλιση με υδατάνθρακες με χρήση αραιωμένων αλκαλίων. Η φυγοκέντρωση διαχωρίζει τα υπολείμματα, ακολουθούμενη από διήθηση μέσω πορώδους διοξειδίου του πυριτίου και συμπύκνωση με εξάτμιση. Το υλικό που ανακτάται εξωθείται μέσω μικροσωληνών σε ψυχρό διάλυμα χλωριούχου καλίου και στη συνέχεια αφυδατώνεται (Amin S., 2009).

Οι συσκευές που βασίζονται σε διάτμηση της πίεσης, χρησιμοποιούν υψηλές πιέσεις για να αναγκάσουν ένα διάλυμα βιομάζας να εξέλθει μέσω ενός μικρού ανοίγματος. Συνήθως, η ανάκτηση ελαίων κυμαίνεται στο 70-75% σε αυτή τη μέθοδο. Μερικές φορές για ενισχυθεί η μηχανική σύνθλιψη χρησιμοποιούνται επιπλέον χημικές μέθοδοι. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος συντήρησης και η μικρότερη απόδοση σε σύγκριση με άλλες μεθόδους (Kumar R. et al., 2015). Διάφορα προϊόντα που παράγονται από μικροφύκη, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών και χρωστικών ουσιών, έχουν εξαχθεί μέσω μηχανικής εκχύλισης (Πίνακας 3.1.1.).

**Πίνακας 3.1.1.** Η απόδοση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που εξαγονται μέσω μηχανικής εκχύλισης (C.Salinas-Salazar et.al, 2019).

Μέθοδος	Στέλεχος	Προϊόν	Απόδοση %
Άλεση	<i>Chlorella vulgaris</i>	Λιπίδια	11
	<i>Chlorella protothecoides</i>	Λιπίδια	18,8

	<i>Botryococcus sp.</i>	Λιπίδια	28
	<i>Phaeodactylum tricronutum</i>	Λιπίδια	40
<b>Πίεση</b>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Πρωτεΐνες	91
	<i>Spirulina platensis</i>	Φυκοκυανίνη	82,48
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ασταξανθίνη	3,4
	<i>Chlorococcum infusarium</i>	Λιπίδια	96,2

#### 3.1.1.4.3. Κρυοξήρανση ή Λυοφιλίωση

Ευνοεί την εκχύλιση λιπιδίων από βιομάζα μικροφυκών, καθώς μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια πτητικών λιπιδίων λόγω εξάτμισης. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην κρυστάλλωση του ενδοκυττάρου νερού με ψύξη της υγρής βιομάζας σε θερμοκρασία ~ -80°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα αποψύχονται, έτσι ώστε να επέλθει λύση των κυττάρων από την διαστολή των κρυστάλλων πάγου. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με μια άλλη μέθοδο, όπως υπερήχους, εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ή άλεση με σφαιρίδια, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης (Aarthy A. et al., 2018). Ωστόσο, οι κύκλοι ψύξης-απόψυξης πρέπει να διαχειρίζονται με προσοχή. Μελέτη του μεταβολικού προφίλ των θαλάσσιων μικροφυκών κάτω από πρότυπες θερμοκρασίες ψύξης (-20°C και -78°C), για 1 και 2 κύκλους των 7 ημερών κάθε φορά, αναφέρει ότι τα μη κατεψυγμένα δείγματα έδειξαν μείωση κατά 10% στην απόδοση (Eilertsen H. et al., 2014).

#### 3.1.2 Προηγμένες τεχνικές εκχύλισης (π.χ. μικροκύματα, εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού)

##### 3.1.2.1. Ενζυματικές μέθοδοι

Στις διαδικασίες ενζυμικής εκχύλισης, ένας συνδυασμός ενζύμων χρησιμοποιείται ώστε να διαρραγεί το κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών και να αποβληθούν τα λιπιδικά σωματίδια έξω από το κύτταρο, ώστε να διαχωριστεί το λιπιδικό κλάσμα από τη μήτρα λιπιδίων/πρωτεϊνών. Η ενζυμική λύση είναι μια εναλλακτική λύση στη μηχανική διάσπαση των κυττάρων. Τα λυτικά ένζυμα πρέπει να είναι ειδικά για τα είδη των μικροφυκών, με συννηθέστερα την κυτταρινάση και τη λιπάση λόγω της παρουσίας πολυσακχαριτών, όπως κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, στα κυτταρικά τοιχώματα των φυκών και των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από φωσφολιπίδια (Aarthy A. et al., 2018).

Η υδατική ενζυμική υποβοηθούμενη εκχύλιση (Aqueous enzymatic assisted extraction, AEAE) είναι μια τεχνική κυτταρικής διαρραγής για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη. Τα χαρακτηριστικά των ενζύμων αυτών περιλαμβάνουν υψηλή εκλεκτικότητα, ήπιες συνθήκες αντίδρασης (ουδέτερο pH, επώαση από 25°C έως 37 °C) και πρέπει να υπάρχει απουσία των σταδίων εντατικής ξήρανσης (Sierra LS et al., 2017). Μια αναφορά παρουσιάζει μια βελτιωμένη μέθοδο ενζυμικής λύσης σε συνδυασμό με θερμική επεξεργασία για εκχύλιση λιπιδίων από *N. oceanica*, βρίσκοντας τις βέλτιστες παραμέτρους εκχύλισης σε 37°C, pH 5,0, 1,3% κυτταρινάση, αναλογία υγρού/στερεού 15 mL/g για 5 ώρες. Αυτές οι συνθήκες απέδωσαν έως και 28,8% των λιπιδίων (Chen G. et al., 2014).

Τα κύρια βήματα για την ενζυμική εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη περιλαμβάνουν: τη συλλογή βιομάζας, την προετοιμασία και την προσθήκη ενζύμων, ανάδευση για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυκών, προσθήκη διαλύτη (εάν χρειάζεται), τη φυγοκέντρηση και την ανάκτηση των λιπιδικών κλασμάτων (Sierra LS et al., 2017). Τα κύρια προϊόντα μικροφυκών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον και λαμβάνονται με ενζυμικές μεθόδους είναι: τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.2.

**Πίνακας 3.1.2.** Η απόδοση των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που εξάγονται με ενζυματική εκχύλιση (*C.Salinas-Salazar et.al, 2019*).

Στέλεχος	Ένζυμο	Προϊόν	Απόδοση %
<i>C. vulgaris</i>	Σελουλάση	Λιπίδια	25
	Κυτταρινάση		23
	Snailase		7
<i>N. oceanica</i>	Σελουλάση	Πρωτεΐνες	29,9
		Λιπίδια	28,8

### 3.1.2.2. Τεχνολογία εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical Fluid Extraction, SFE) χρησιμοποιεί τις διαλυτικές ιδιότητες ενός υπερκρίσιμου υγρού (Πίνακας 3.1.3.), εφαρμόζοντας πίεση και θερμοκρασία υψηλότερα από το κρίσιμο σημείο μίας ένωσης ή μείγματος. Οι ρυθμιζόμενες παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για την SFE περιλαμβάνουν τον διαλύτη, τη

θερμοκρασία, την πίεση, το χρόνο εκχύλισης, το ρυθμό ροής του διαλύτη, το μέγεθος δείγματος, τη χρήση του τροποποιητή και το μέγεθος των σωματιδίων (Sharif KM et al., 2014).

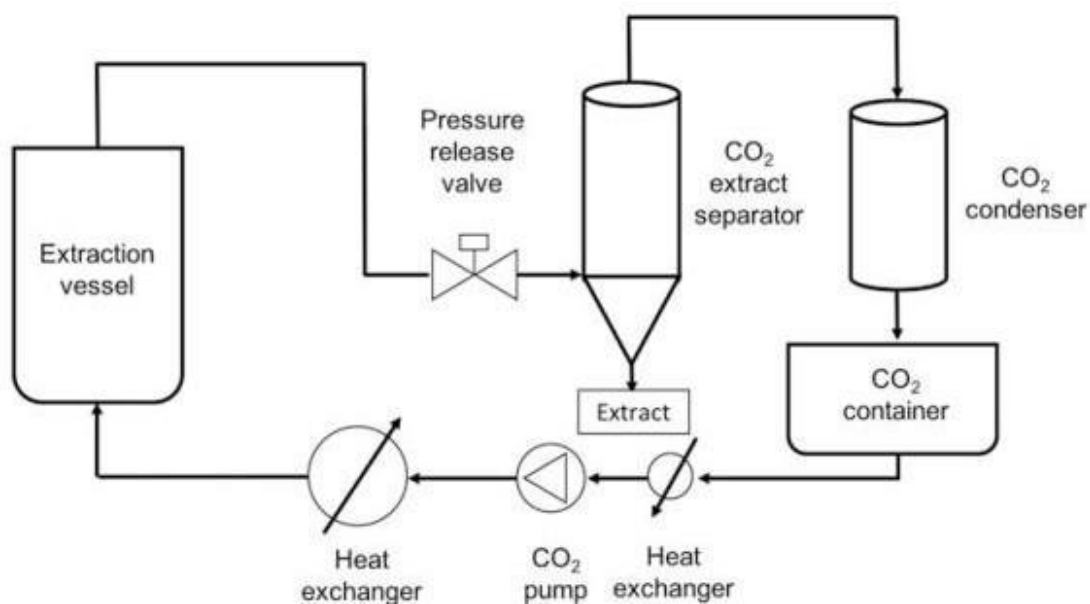
**Πίνακας 3.1.3.:** Κρίσιμες ιδιότητες των διαφόρων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις διεργασίες εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού (Molino A. et al, 2020).

Κρίσιμος διαλύτης	Κρίσιμη θερμοκρασία (°C)	Κρίσιμη πίεση (MPa)	Κρίσιμος όγκος (cm <sup>3</sup> /mol)
Αμμωνία	405.4	11.35	72.5
CO <sub>2</sub>	31.1	7.37	94.1
Διμεθυλαιθέρας	126.95	5.27	171.0
Αιθάνιο	32.15	4.87	145.5
Αιθυλένιο	9.15	5.04	131.0
Μεθανόλη	239.45	8.09	118.0
n-Εξάνιο	234.35	3.02	368.0
Προπάνιο	96.65	4.25	200.0
Νερό	373.95	22.06	55.9
Ξένο	16.95	5.80	118.0
Ελαιόλαδο	720.0	0.33	204.0
Σογιέλαιο	697.0	0.33	192.0

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού με διοξείδιο του άνθρακα (SFE-CO<sub>2</sub>) έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική τεχνική πράσινης εκχύλισης, για να αποφευχθεί η χρήση τοξικών διαλυτών (Hernández et al. 2014). Τα πλεονεκτήματα του SFE-CO<sub>2</sub> συνίστανται στο χαμηλό κρίσιμο σημείο CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία δωματίου σε σχετικά χαμηλή πίεση (30,9°C και 73.9 bar) και αναγνωρίζεται γενικά ως ασφαλές (Generally Recognized as Safe, GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων της Αμερικής (FDA) και φιλική προς το περιβάλλον (Reverchon και De Marco 2006; Esquivel-Hernández et al. 2016). Σε υπερκρίσιμες συνθήκες, το CO<sub>2</sub> διεισδύει εύκολα στο κυτταρικό τοίχωμα λόγω της υψηλής διαπερατότητας και των παραμέτρων διάχυσής του (Roojary M.M. et al., 2016). Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης του SCF-CO<sub>2</sub> είναι ότι έχει χημική συμπεριφορά παρόμοια με εκείνη των λιπόφιλων διαλυτών. Στην πραγματικότητα, είναι ικανό να εκχυλίσει μη πολικές ενώσεις επειδή το CO<sub>2</sub> είναι μη πολικός διαλύτης. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, ουσίες με αντίθετη πολικότητα, όπως το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη, χρησιμοποιούνται συχνά ως συν-διαλύτες για την τροποποίηση της πολικότητας του διαλύτη (G. Di Sanzo et al, 2018). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδικά στα

συμπληρώματα διατροφής με βιοδραστικές ενώσεις, τα φυσικά έλαια όπως το έλαιο σόγιας και το ηλιέλαιο χρησιμοποιούνται ως συν-διαλύτες. Ωστόσο, η σύνθεση του εκχυλίσματος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της εκχύλισης όπως η θερμοκρασία, η πίεση, οι συν-διαλύτες, ο ρυθμός ροής του διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης και πρέπει να βελτιστοποιηθούν για την αποτελεσματική ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων (Cheng X. et al., 2018). Επιπλέον, το CO<sub>2</sub> γίνεται αέριο μετά την αποσυμπίεση και διαχωρίζεται έτσι από το δείγμα χωρίς να αφήνει υπολειμματικά ίχνη και μπορεί να συλλεχθεί για ανακύκλωση για μεταγενέστερες εκχυλίσεις, γεγονός που από μόνο του φέρνει οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη.

Στην Εικόνα 3.1.1., απεικονίζεται η συσκευή SFE (Laitinen, 1999). Ιδιαίτερα χρήσιμο για την εκχύλιση βιοντίζελ, το υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> είναι εξαιρετικά επιλεκτικό για μη πολικά λιπίδια, όπως τα τριγλυκερίδια και δεν διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια (Hernández et al. 2014). Άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SFE περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες (εξάνιο, πεντάνιο, βουτάνιο), υποξείδιο του αζώτου, εξαφθοριούχο θείο και φθοριωμένους υδρογονάνθρακες (Reverchon και De Marco 2006).



**Εικόνα 3.1.1.** Συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης υγρών (Laitinen, 1999).

Στην SCF-CO<sub>2</sub> εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την πίεση του CO<sub>2</sub> και τη θερμοκρασία μέχρι το βέλτιστο επίπεδο. Ωστόσο, η υψηλότερη θερμοκρασία προκαλεί θερμική υποβάθμιση των ενώσεων, ενώ μεγαλύτερη πίεση μπορεί να εμποδίσει τη διάχυση του υπερκρίσιμου υγρού στη μήτρα, η οποία οδηγεί σε μειωμένη



απόδοση εκχύλισης (Poojary M. M. et al., 2016). Επιπλέον, η διαλυτότητα σχετίζεται στενά με την πυκνότητα του SCF-CO<sub>2</sub> και τις ιδιότητες της διαλυμένης ουσίας, όπως η μοριακή μάζα, η πολικότητα και η τάση ατμών (Poojary M.M. et al., 2016). Το CO<sub>2</sub> εκδηλώνει περιορισμένη ικανότητα εξαγωγής ενώσεων υψηλής πολικότητας σε υψηλές πυκνότητες. Η προσθήκη τροποποιητών πολικότητας (συν-διαλυτών) στο CO<sub>2</sub> μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αυξάνοντας τη διαλυτότητα των πολικών και μη πολικών βιοδραστικών ενώσεων. Η προσθήκη συν-διαλύτη επιτρέπει τη διόγκωση της βιομάζας των μικροφυκών, αυξάνοντας έτσι τον εσωτερικό όγκο και την επιφάνεια διεπαφής, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταφορά μάζας δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τις ενδοκυτταρικές ενώσεις της βιομάζας και αυξάνοντας την πολικότητα του διαλύτη (C.G. Pereira & M.A.A. Meireles, 2010). Για παράδειγμα, το β-καροτένιο είναι μια μη πολική ένωση και λόγω του μεγαλύτερου μοριακού βάρους του έχει χαμηλότερη διαλυτότητα στην SCF-CO<sub>2</sub>. Επομένως, η προσθήκη πολικού συν-διαλύτη βελτιώνει την απόδοση εξόρυξης (Cardoso L.C. et al., 2012). Προσθήκη αιθανόλης 5 % (v/v) ως συν-διαλύτη επιτρέπει την εκχύλιση παλμιτολεϊκού και λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια χρήσης της SCF-CO<sub>2</sub> (Cardoso L.C. et al., 2012). Μεταξύ των διαφόρων συν-διαλυτών, η αιθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως συν-διαλύτης στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων λόγω μικρότερης τοξικότητας, καθώς θεωρείται ως διαλύτης ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικά, τρόφιμα και φαρμακευτικές βιομηχανίες (Cardoso L.C. et al., 2012).

### 3.1.2.3. Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων

Η εκχύλιση με υποβοήθηση μικροκυμάτων (Microwave-assisted extraction, MAE) βασίζεται στην επαφή μιας διηλεκτρικής πολικής ουσίας (π.χ. νερό) και ενός ταχέως ταλαντευόμενου ηλεκτρικού πεδίου, που παράγεται από μικροκύματα, που παράγουν θερμότητα λόγω της τριβής που προκαλείται από τις διαμοριακές και ενδομοριακές κινήσεις. Η θερμότητα προκαλεί τον σχηματισμό υδρατμών στο κύτταρο, ο οποίος τελικά προκαλεί ρήξη και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών, οδηγούμενη από ένα φαινόμενο ηλεκτροδιάτρησης (Ghasemi Naghdi F. et al., 2016). Για τη MAE, οι κύριες παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιλαμβάνουν τον χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία, τις διηλεκτρικές ιδιότητες του μείγματος διεργασίας, την αναλογία στερεού/υγρού και τον τύπο και τη συγκέντρωση του διαλύτη (Ghasemi Naghdi et al. 2016)

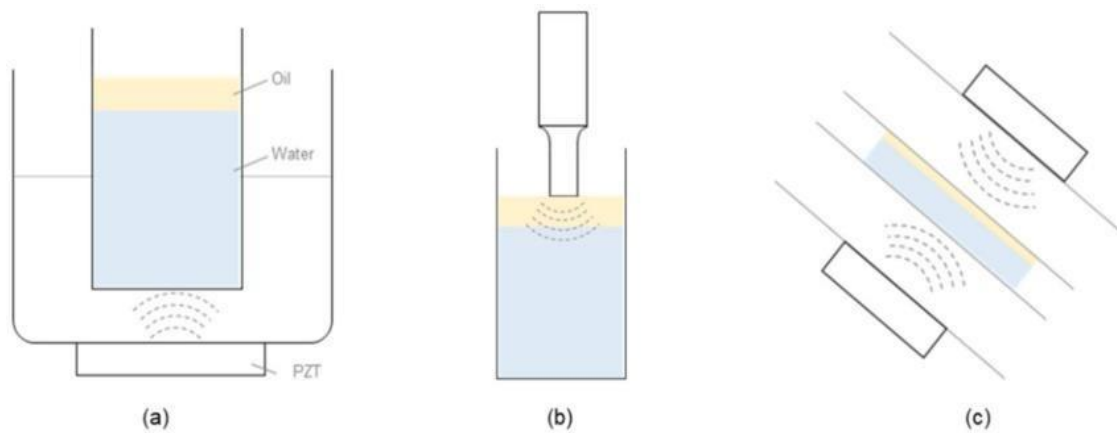
Η MAE θεωρείται ως μια ταχεία, απλή, ασφαλής, αποτελεσματική και οικονομική μέθοδος για την εκχύλιση λιπιδίων που δεν απαιτούν την αφυδάτωση των δειγμάτων (Kumar R. et al., 2015). Επιπλέον, τα μικροκύματα που έχουν υποστεί προεπεξεργασία από μικροκύματα

παρουσιάζουν πολλαπλές μικρο-ρωγμές εντός του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες αποδίδουν υψηλότερες ανακτήσεις βιοελαίου (Šoštarič M. et al., 2012). Εκτός από την εκχύλιση, τα μικροκύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετεστεροποίηση ελαίων στο βιοντίζελ και αποτελούν μια ελκυστική επιλογή, δεδομένου ότι απαιτεί σύντομο χρόνο αντίδρασης (15–20 λεπτά), χαμηλό λειτουργικό κόστος και αποτελεσματική εκχύλιση ελαίων των μικροφυκών. Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος συντήρησης σε εμπορική κλίμακα (Kumar R. et al., 2015).

#### 3.1.2.4. Εκχύλιση με υπερήχους

Οι εκχυλίσεις με υπερήχους (Ultrasound assisted extraction, UAE) μπορούν να ανακτήσουν έλαια από κύτταρα μικροφυκών μέσω δημιουργίας του φαινομένου της σπηλαίωσης (Harun R. et al., 2010). Κατά τη διάρκεια του κύκλου χαμηλής πίεσης - υψηλής έντασης, μικρές φυσαλίδες κενού δημιουργούνται στο υγρό. Όταν οι φυσαλίδες επιτύχουν ένα ορισμένο μέγεθος, καταρρέουν βίαια κατά τη διάρκεια ενός κύκλου υψηλής πίεσης. Κατά τη διάρκεια της κατάρρευσης πολύ υψηλές πιέσεις και ρεύματα υγρού υψηλής ταχύτητας παράγονται τοπικά και το αποτέλεσμα είναι η διάσπαση μηχανικά της κυτταρικής δομής, ευνοώντας την εκχύλιση των ουσιών (Wei F. et al., 2008).

Τα υπερηχητικά κύματα παράγουν κύκλους υψηλής πίεσης που επιτρέπουν τη διάχυση διαλυτών, όπως το εξάνιο, στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών. Η μεταφορά λιπιδίων από το κύτταρο στο διαλύτη υποβοηθείται από υπερήχους μέσω της μηχανικής θραύσης του κυτταρικού τοιχώματος (Cravotto G. et al., 2008). Η ανάκτηση λιπιδίων μπορεί να ενισχυθεί με την αύξηση του χρόνου έκθεσης και με τη χρήση μείγματος πολικών και μη πολικών διαλυτών. Επίσης, οι UAE ευνοούν την απελευθέρωση των ουσιών του κυττάρου στο διαλύτη. Μπορούν να πραγματοποιηθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες το οποίο είναι ιδανικό χαρακτηριστικό όταν ο στόχος της εκχύλισης είναι θερμικά ευαίσθητα μόρια (Ghasemi Naghdi F. et al., 2016). Το λουτρό και η κόρνα είναι οι δύο βασικοί τύποι συσκευών υπερήχων και μπορούν να προσαρμόζονται και για συνεχείς λειτουργίες (Εικόνα 3.1.2.) (Hosikian A. et al., 2010).



**Εικόνα 3.1.2.** Τρεις μέθοδοι της εκχύλισης με υπερήχους: (a) λουτρό-, (b) κόρνας και (c) εστιασμένου-τύπου υπερήχων (Hosikian et.al, 2010)

### 3.1.2.5. Τεχνολογίες παλμικού ηλεκτρικού πεδίου

Η επεξεργασία παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed electric field, PEF) είναι μια μέθοδος επεξεργασίας κυττάρων μέσω σύντομης άσκησης παλμών ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (Guderjan M. et al., 2007). Η βιομάζα των μικροφυκών τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και πραγματοποιείται εφαρμογή παλμικού ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό πεδίο διευρύνει τους πόρους των κυτταρικών μεμβρανών και έτσι το κύτταρο μπορεί να αποβάλλει τις ουσίες που υπάρχουν στο εσωτερικό του (Guderjan M. et al., 2005).

## 3.2 Τεχνικές απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη

### 3.2.1. Φασματοφωτομετρία

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και των ολικών φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα πολυφαινολών μικροφυκών (Haoujar I. et al., 2019). Ενώ οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι είναι ταχείες και απλές, δεν διαθέτουν την ειδικότητα για μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις. Παρεμβολές από μη πολυφαινολικά συστατικά μπορούν επίσης να προκαλέσουν λανθασμένες ενδείξεις και έτσι να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, ορισμένα αμινοξέα, ιόντα μετάλλων και άλλες αναγωγικές ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα και έχουν αναγωγικές δυνάμεις μπορούν να μειώσουν χημικούς δείκτες (Shahidi F. and Yeo J., 2020). Επομένως, οι μέθοδοι αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ως προκαταρκτική αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά πριν από μια πιο ενδελεχή χρωματογραφική αξιολόγηση (Panche A.N. et al., 2016; Shahidi F. and Yeo J., 2020).

### 3.2.2. Χρωματογραφικές Μέθοδοι

Γενικά, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography, HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography, GC) είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στον τομέα της έρευνας των μικροφυκών. Η μέθοδος της χρωματογραφίας είναι σε θέση να διαχωρίζει σκόπιμα διαφορετικές ενώσεις μεταξύ τους σε ένα μείγμα, αλλά απαιτείται συμπληρωματική τεχνική για την ανίχνευση και/ή την ποσοτικοποίηση των ουσιών. Ένα ευρύ φάσμα μεθόδων έχει οδηγήσει σε ανάλυση διαφόρων ενώσεων. Η επιλογή της μεθόδου σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη χημική δομή των ενώσεων-στόχων καθώς και από τις συγκεντρώσεις τους. Η κύρια αρχή πίσω από αυτή την τεχνική διαχωρισμού είναι η διαφορά μεταξύ των ενώσεων όσον αφορά την αλληλεπίδρασή τους με δύο φάσεις, μία σταθερή φάση και μια άλλη κινητή φάση (Tarafer A. and Miller L., 2021; Kumari V. B. C. et al., 2022). Η χρωματογραφία ταξινομείται με βάση τον τύπο της σταθερής και κινητής φάσης που χρησιμοποιείται, καθώς και του τρόπου λειτουργίας της συσκευής. Μια σύνοψη των διαφόρων χρωματογραφικών μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.1.

**Πίνακας 3.2.1.** Περίληψη των διαφόρων τεχνικών και των αρχών που διέπουν τις διάφορες μεθόδους χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση συστατικών μικροφυκών (Kiani H et al, 2022).

Μέθοδος	Υποκατηγορία	Γενικές Αρχές	Ανιχνευτές	Εφαρμογή
Υγρή Χρωματογραφία / HPLC	Ιοντό- ανταλλαγής	Ιονική αλληλεπίδραση με την στατική φάση και τη κινητή φάση. Η κινητή φάση αλλάζει κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού	Αγωγιμότητας, Ανιχνευτές εκπομπής φωτός  Συστοιχία διόδων(PDA),  Αμπερομετρικοί, ποτενσιομετρικοί,  φασματόμετρο μάζας (MS)	Απομάκρυνση μετάλλων και επεξεργασία νερού.  Ανάλυση και καθαρισμός πρωτεϊνών

	Κανονικής φάσης	Πολική στατική φάση, μη πολική κινητή φάση	MS, UV, Φθορισμός, Δείκτης διάθλασης, Αγωγιμότητα,	Χαμηλού ή υψηλού μοριακού βάρους πολικές ενώσεις, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, ολιγοσακχαρίτες και μεταβολίτες Διαφοροποίηση μεταξύ των λιπιδίων και στερολών
	Αντίστροφης Φάσης	Μη πολική στατική φάση, πολική κινητή φάση		Διαφορετικές οργανικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των οξέων, σάκχαρα, χρωστικές, βιταμίνες, πολυφαινόλες, λιπαρά οξέα, πολικά λιπίδια, πτητικές ενώσεις, αμινοξέα, φλαβονοειδή
	Αποκλεισμός λόγω μεγέθους	Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος ή το βάρος, ροή μέσα από στήλη που περιέχει πολυμερή		Εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, Βιομόρια και άλλες μικρές πρωτεΐνες και πεπτίδια

	Διαχωρισμός συγγένειας	Συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων και συγκεκριμένη ουσία στη στήλη, άκρως εκλεκτική μέθοδος		Διαφορετικοί πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες
<b>Χρωματογραφία χάρτου</b>		Παλαιά μέθοδος, αντικαταστάθηκε από άλλες νέες τεχνικές		Φλαβονοειδή, χλωροφύλλη
<b>Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας</b>		Λεπτό στρώμα υδρόφιλης ένωσης εναποτίθεται σε ένα φύλλο, η κινητή φάση διαχέεται με τριχοειδική δράση. Διαχωρισμός εκτελείται με βάση τη διαλυτότητα σε διαλυτικό μέσο		Ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των χρωστικών των μικροφυκών, φαινολικές ενώσεις στεροειδή λιπίδια
<b>Αέρια Χρωματογραφία</b>		Η κινητή φάση είναι ένα θερμαινόμενο αέριο	MS, Ιοντισμός φλόγας (FID), Φλογοφωτομετρία (FPD), Ατομική εκπομπή, Θερμική αγωγιμότητα, φωτογραφία ιονισμού	Λιπίδια και λιποδιαλυτές ενώσεις, το προφίλ λιπαρών οξέων, πτητικές ενώσεις

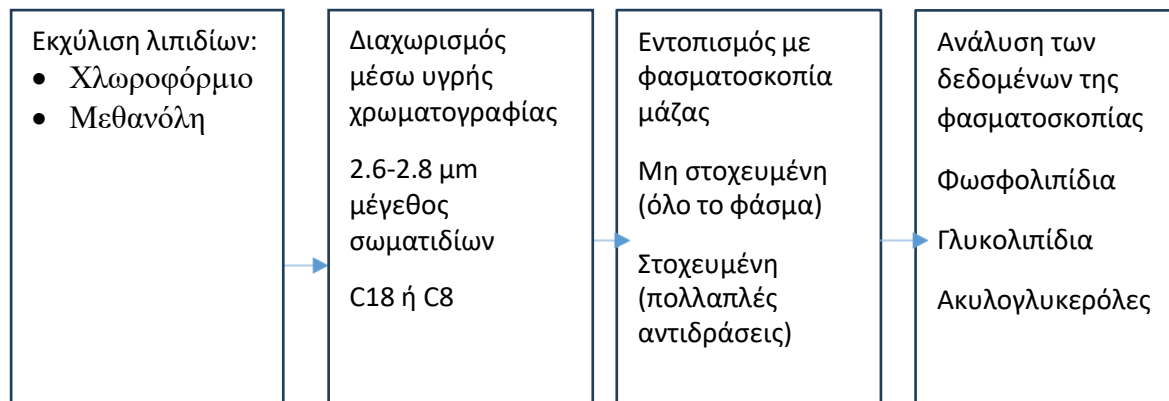
<b>Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου υγρού  (SFC)</b>		Τα υγρά χρησιμοποιούνται στην υπερκρίσιμη περιοχή τους (Θερμοκρασία και πίεση ελεγχόμενη)	Ιοντισμός φλόγας (FID), Φλογοφωτομετρία (FPD)	Καροτενοειδή, λιπιδική ανάλυση, άλλοι μεταβολίτες
--	--	---	--	---

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων που ανακτώνται από πολύπλοκες μήτρες, όπως τα μικροφύκη. Λαμβάνοντας υπόψη τη σχετικά μη πολική φύση των φαινολικών ενώσεων, οι στήλες αντίστροφης φάσης (C-18) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ως στατική φάση για τη χρωματογραφία πολυφαινολών. Ο διαχωρισμός των πολυφαινολών πραγματοποιείται συνήθως με διαβάθμιση με τη χρήση κινητής φάσης πολλαπλών συστατικών (ή εκλυτικού μέσου) που αποτελείται από ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και έναν οργανικό διαλύτη (Dahmen-Ben Moussa I. et al., 2022).

Ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο. Η κινητή φάση συχνά αναμιγνύεται με ένα ασθενές οξύ όπως μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ ή τριφθοροαιθανικό οξύ για τη βελτίωση της συγκράτησης, το διαχωρισμό και το σχήμα των κορυφών με την καταστολή του ιονισμού των επιφανειακών ομάδων σιλινόλης που υπάρχουν στη σταθερή φάση (Dahmen-Ben Moussa I. et al., 2022). Η HPLC μπορεί να συνδεθεί με διαφορετικούς ανιχνευτές για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές για την ανάλυση πολυφαινολών είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV/Vis) και ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD). Η επεξεργασία των χρωματογραφικών δεδομένων που λαμβάνονται με HPLC-UV/Vis ή HPLC-DAD είναι απλή. Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι η ταυτοποίηση των πολυφαινολών με χρήση UV/Vis με σταθερού μήκους κύματος ανιχνευτή είναι επιρρεπής σε αβεβαιότητες (Maalej A. et al., 2022). Η HPLC σε συνδυασμό με φασματομέτρο μάζας (HPLC-MS) χρησιμοποιείται επίσης ευρέως για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των πολυφαινολών λόγω της ικανότητάς του να προσδιορίζει τη μοριακή μάζα και έτσι τη δομή άγνωστων ενώσεων (Διάγραμμα 3.2.1.) (Carrasco-Pancorbo A. et al., 2007). Οι μεμονωμένες πολυφαινόλες μπορούν πρώτα να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία λεπτής

στιβάδας (Stalikas C. D., 2007) ή προπαρασκευαστική χρωματογραφία πριν από την HPLC για την υποβοήθηση της ταυτοποίησης και στη συνέχεια μπορεί να χαρακτηριστεί περαιτέρω μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



**Διάγραμμα 3.2.1.** Πρωτόκολλο της ανάλυσης HPLC-MS για την ανάλυση λιπιδίων μικροφυκών (Kiani H et.al, 2022).

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των χρωστικών όπως τα καροτενοειδή, οι φυκοπρωτεΐνες και οι χλωροφύλλες περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και HPLC (Πίνακας 3.2.2.). Οι χλωροφύλλες μετά την επιτυχή εκχύλιση, μπορούν να αναλυθούν με HPLC ανεστραμμένης φάσης χρησιμοποιώντας στήλες C18 ή C30. Μείγματα διαφορετικών πολικών απρωτικών διαλυτών (διχλωρομεθάνιο, ακετονιτρίλιο, ακετόνη) και πρωτικών διαλυτών (διαιθυλαιθέρας, μεθανόλη, νερό κ.λπ.) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κινητή φάση. Οι βαθμίδες έκλυσης (αντί της ισοκρατικής έκλυσης) προτιμώνται για ακριβέστερα αποτελέσματα (Maroneze M. M. et al., 2019). Η χρωματογραφία παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον καθαρισμό και όσο και στην ανάλυση της φυκοκυανίνης. Η πλειονότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία βασίζεται στην καθίζηση θειικού αμμωνίου ακολουθούμενη από μια σειρά διαφορετικών μεθόδων χρωματογραφικού διαχωρισμού για καθαρισμό της φυκοκυανίνης. Εφαρμογή της ιοντικής χρωματογραφίας, χρωματογραφία διήθησης πηκτής και χρωματογραφία συγγένειας ή ένας συνδυασμός μεταξύ τους, επίσης, έχουν αναφερθεί (Kissoudi M. et al., 2018).



**Πίνακας 3.2.2.** Περίληψη των χρωματογραφικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση διαφόρων καροτενοειδών μικροφυκών (Kiani H. et al., 2022).

Χρωστική	Είδος HPLC	Κινητή Φάση	Πηγή
<b>Λουτεΐνη</b>	Αντίστροφης φάσης C18,  αντίστροφης φάσης C8,  αντίστροφης φάσης C30	Μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο, ακετονιτρίλιο:  απεσταγμένο νερό, ακετονιτρίλιο/μεθανόλη,  μεθανόλη: οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη/ακετόνη,  οξικός αιθυλεστέρας	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Tetradedmus sp.</i> ,  <i>Coccomyxa acidophila</i> , <i>Dunaliella</i>
<b>Βιολαξανθίνη</b>	Αντίστροφης φάσης C18,  αντίστροφης φάσης C8,	Οξικός αιθυλεστέρας, ακετονιτρίλιο/απεσταγμένο νερό,  διχλωρομεθάνιο/ακετονιτρίλιο/μεθανόλη	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Coccomyxa acidophila</i> , <i>Scenedesmus dimorphus</i>
<b>Ασταξανθίνη</b>	Αντίστροφης φάσης C8	Οξικός αιθυλεστέρας, ακετονιτρίλιο/απεσταγμένο νερό,  διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο/  νερό, ακετονιτρίλιο/μεθανόλη/Tris-HCl,  μεθανόλη/οξικός αιθυλεστέρας, διχλωρομεθάνιο/  ακετονιτρίλιο/μεθανόλη	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> ,  <i>Scenedesmus dimorphus</i>

<b>Φουκοξανθίνη</b>	Αντίστροφης φάσης C8,  αντίστροφης φάσης C30	Νερό/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, μεθανόλη/  μεθυλ-τεрт-βουτυλ αιθέρας/νερό	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Phaeodactylum</i>  <i>tricornutum</i> , <i>Nitzschia laevis</i>
<b>Ζεαξανθίνη</b>	Αντίστροφης φάσης C18,  αντίστροφης φάσης C8,	Οξεικός αιθυλεστέρας, ακετονιτρίλιο/απεσταγμένο νερό,  διχλωρομεθάνιο/ακετονιτρίλιο/μ εθανόλη	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Coccomyxa</i>  <i>acidophila</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>dimorphus</i>
<b>Καροτένιο</b>	Αντίστροφης φάσης C18,  αντίστροφης φάσης C8,	Μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο, Ακετονιτρίλιο/  απεσταγμένο νερό, οξεικός αιθυλεστέρας,  διχλωρομεθάνιο/ακετονιτρίλιο/μ εθανόλη	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Coccomyxa</i> <i>acidophila</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>dimorphus</i> ,  <i>Dunaliella</i>

Η αέρια χρωματογραφία (GC) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μικροφύκη για τον χαρακτηρισμό πτητικών ενώσεων όπως τα λιπαρά οξέα και οι μεθυλεστέρες (Yu J. et al., 2020) και για τον χαρακτηρισμό πιθανών μολυσματικών ουσιών στη χλωρέλλα και τη σπιρουλίνα (Martín-Girela I. et al., 2020). Η GC θεωρείται γενικά πιο ισχυρή και ευαίσθητη τεχνική σε σύγκριση με την HPLC και συνήθως συνδυάζεται με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID), ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD) και φασματομετρία μάζας. Η GC δεν χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μικροφυκών πολυφαινολών.

Η ανάλυση GC είναι σήμερα η καθολική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) λόγω της αξιοπιστίας, της ευκολίας προετοιμασίας του δείγματος και της ανάλυσης των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.2.3.) (Goh B. et al, 2019). Επιτρέπει την αναγνώριση και τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων (συμπεριλαμβανομένων των ω-3 PUFA) που υπάρχουν στο εκχύλισμα λιπιδίων των

μικροφυκών. Η μέθοδος είναι γραμμική για ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων λιπαρών οξέων και έχει ένα ευρύ φάσμα αναγνώρισης για διάφορα μήκη της αλυσίδας των λιπαρών οξέων (Goh B. et al., 2019). Απαιτείται αντίδραση μετεστεροποίησης για τη μετατροπή των λιπιδίων μετά την εκχύλιση από βιομάζα μικροφυκών, σε μεθυλεστέρες πτητικών λιπαρών οξέων (FAMES) που είναι κατάλληλοι για την ανάλυση μέσω της GC (Halim R. et al., 2012). Κατά τη διάρκεια της μετεστεροποίησης, τα λιπίδια αναμειγνύονται με μεθανόλη παρουσία καταλύτη. Η αντίδραση διασπά τα λιπαρά οξέα από την τριακυλογλυκερόλη και οι φωσφολιπιδικές και γλυκολιπιδικές δομές και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σχηματίζουν έτσι FAMES (Halim R. et al., 2012). Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης GC, οι FAMES διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση την αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση της στήλης GC και τα σημεία βρασμού. Οι FAMES με ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση θα παραμείνουν στη στήλη περισσότερο και έτσι έχουν υψηλότερους χρόνους διατήρησης σε σύγκριση με αυτά με ασθενέστερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση.

**Πίνακας 3.2.3.** Χρωματογραφία GC και οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε πρόσφατες μελέτες που περιλαμβάνουν ανάλυση ω-3 PUFA από μικροφύκη (Kiani H. et al., 2022).

Είδος	Κινητή/ Στατική φάση	Παράμετροι Αέριας Χρωματογραφίας	Συστατικά
<i>Nannochloropsis sp.</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i>	DB-23 (κυανοπροπυλ πολυσιλοξάνη)/ Ήλιο/FID	Στήλη: 0,32 mm id x 30 m x 0,25 μm Φούρνος: 50–210 °C FID:300 °C	ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα: C20:5 (n-3) πολυακόρεστα: C14:0, C16:0, C16:1, C18:1, C18:2, C20:3
Εννέα διαφορετικά είδη, συμπεριλαμβανομένων <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> και <i>Rhodomonas salina</i>	EC-Wax (PEG)/δεν υπάρχουν πληροφορίες για κινητή φάση/FID	Στήλη: 0,32 mm id x 30 m x 0,25 μm Φούρνος: 70–235°C	ω-3 πολυακόρεστα: C18:3 (n-3), C18:4 (n-3), C20:5 (n- 3), C22:5 (n-3), C22:6 (n-3)
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Nannochloropsis sp</i>	VF-5 MS (φαινυλομεθυλοπολυσιλοξάνη)/	Στήλη: 10 m x 0,25 μm Φούρνος:	ω-3 : C20:3 (n- 3), C20:5 (n-3)

	Ήλιο/MSD	50–230°C Έγχυση: 250°C	και πολύαριθμα κορεσμένα λιπαρά οξέα
<b>16 διαφορετικά είδη μικροφυκών</b>	Κατάσταση 1: DB-5 MS (μεθυλοπολυσιλοξάνη)/He/MSD Κατάσταση 2: DB Wax (PEG)/He/FID	Για την συνθήκη 1: στήλη: 0,25 mm id x 30 m x 0,25 μm, φούρνος: 45–320°C, έγχυση: 240°C, MSD: 230°C. συνθήκη 2: στήλη: 0,25 mm id x 30 m x 0,25 μm, φούρνος: 25–250°C, έγχυση: 100°C, FID: 280°C	ω-3 : C18:3 (n- 3)  πολύαριθμα κορεσμένα και  μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>	EZ-Guard VF 5 ms (διμεθυλοπολυσιλοξάνη)/ TOF-MS	Στήλη: 0,25 mm id x 30 m x 0,25 μm	ω-3 : C18:2 (n- 3)  πολύαριθμα κορεσμένα και  μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

### 3.3 Σύγχρονες στρατηγικές για την εκχύλιση και απομόνωση

#### 3.3.1. Μέθοδος οσμωτικής πίεσης

Μια καινοτόμος και εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση της οσμωτικής πίεσης για εκχύλιση καθώς θεωρείται ένας οικολογικός και οικονομικά αποδοτικός τρόπος (Adam F. et al., 2012). Η οσμωτική πίεση μπορεί να διαταράξει τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροφυκών μέσω μιας γρήγορης αύξησης και μείωσης της συγκέντρωσης αλάτων των υδατικών μέσων. Αυτό μπορεί να διαταράξει την ισορροπία της οσμωτικής πίεσης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος των κυττάρων των μικροφυκών. Η βλάβη των κυττάρων των

φυκών μπορεί να συμβεί είτε από υπερ-οσμωτικό ή υπο-οσμωτικό στρες. Όταν η συγκέντρωση άλατος είναι υψηλότερη στο εξωτερικό, τα κύτταρα υφίστανται υπερ-οσμωτικό στρες. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα συρρικνώνονται καθώς τα υγρά μέσα στα κύτταρα διαχέονται προς τα έξω και προκαλείται βλάβη στα κύτταρα. Αντίθετα, το υπο-οσμωτικό στρες συμβαίνει όταν η συγκέντρωση άλατος είναι χαμηλότερη στο εξωτερικό περιβάλλον των κυττάρων. Το υγρό ρέει μέσα στα κύτταρα για να εξισορροπήσει την οσμωτική πίεση και τα κύτταρα διογκώνονται ή εκρήγνυνται. Το υπο-οσμωτικό στρες είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση ενδοκυτταρικών ουσιών από μικροοργανισμούς. Έτσι η μέθοδος αυτή φαίνεται να είναι η πιο απλή, εύκολη και αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση λιπιδίων από μικροφύκη (Kim J. & Yoo G., 2013). Απαιτείται περαιτέρω έρευνα ωστόσο στην εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο της οσμωτικής πίεσης από διάφορα είδη φυκών, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων στελεχών (Yoo G. et al., 2012).

### 3.3.2. Ισοτονική Μέθοδος Εκχύλισης

Η χρήση ιοντικού υγρού για την εκχύλιση των λιπιδίων από μικροφύκη είναι καινοτόμος και αναδυόμενη εναλλακτική τεχνολογία προεπεξεργασίας. Εντατικές μελέτες σχετικά με την εκχύλιση μέσω ιοντικού υγρού σε μικροοργανισμούς έχουν πραγματοποιηθεί από διάφορους ερευνητές (Li Q. et al., 2010; Klein-Marcuschamer D. et al., 2011). Στόχος είναι να αντικατασταθούν οι τοξικοί οργανικοί διαλύτες με ιοντικά υγρά, οι λεγόμενοι "πράσινοι διαλύτες". Τα ιοντικά υγρά είναι μη υδατικά διαλύματα αλάτων που θα μπορούσαν να διατηρηθούν σε υγρή κατάσταση σε μέτριες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 0 - 140°C. Αποτελούνται από ένα μεγάλο ασύμμετρο οργανικό κατιόν και ένα ανόργανο ή οργανικό ανιόν. Αυτά τα ιοντικά υγρά επιτρέπουν τη συνθετική ευκαμψία με τον διακριτό συνδυασμό του ανιόντος και του κατιόντος ώστε να μπορεί κανείς να σχεδιάσει την ειδική πολικότητα, υδροφοβικότητα, αγωγιμότητα και διαλυτότητα του διαλύτη σύμφωνα με τις ανάγκες της κάθε περίπτωσης (Cooney M. et al., 2009). Ωστόσο, μόνο λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε είδη μικροφυκών όπως η *Chlorella vulgaris* (Kim Y. and Choi Y., 2012) για εκχύλιση λιπιδίων μέσω ιοντικού υγρού εκχύλισης.

### 3.3.3. Τεχνολογία υπερκρίσιμου υγρού CO<sub>2</sub>

Η διαδικασία SCF-CO<sub>2</sub> παρουσιάζει ορισμένα ζητήματα, όπως η χαμηλότερη απόδοση μη πολικών καρροτενοειδών, ακαταλληλότητα για δείγματα με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό και υψηλό κόστος εξοπλισμού. Ωστόσο, το υψηλό κόστος του εξοπλισμού της

αντισταθμίζεται από το χαμηλό κόστος λειτουργίας, επειδή μπορεί να λειτουργεί σε συνεχή κατάσταση λόγω της ανακύκλωσης του διαλύτη (Saini K. et al., 2018). Επίσης, οι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις έχουν μεγαλύτερη ζήτηση στην αγορά σε σχέση με τις μη φυσικές και πωλούνται σε προνομιακή τιμή, η οποία μπορεί να καλύψει το υψηλό επενδυτικό κόστος της τεχνολογίας SCF-CO<sub>2</sub> (Poojary M. M. et al., 2016). Για να καταστεί ολόκληρη η διαδικασία εκχύλισης εξαιρετικά αποτελεσματική, η ενσωμάτωση μεθόδων προεπεξεργασίας οφείλει να εξεταστεί. Κατά συνέπεια, αναμένεται ότι η ενσωμάτωση των τεχνολογιών οδηγεί σε μέγιστη ανάκτηση με μεγαλύτερη επιλεκτικότητα των βιοδραστικών ενώσεων που έχουν σημαντικές εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων (Poojary M. M. et al., 2016).

Επιπλέον, οι μελλοντικές εξελίξεις αυτών των τεχνικών θα μπορούσαν να συνδέονται στενά με τη χρήση νέων διαλυτών κατάλληλων για τρόφιμα, όπως ο αιθυλεστέρας του γαλακτικού οξέος, και μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη. Μια άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας επιλέγοντας τους καταλληλότερους διαλύτες/συν-διαλύτες με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους με τη βιοδραστική ένωση. Επιπλέον, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αιθανόλη του CO<sub>2</sub> (CXE) και υγρά διογκωμένα με αέριο (GXL), τα οποία αποτελούνται από ένα μείγμα μεταξύ ενός υγρού διαλύτη και συμπιεσμένου CO<sub>2</sub>, όπου οι ιδιότητες της υγρής φάσης διαφέρουν σημαντικά από εκείνες της ατμοσφαιρικής πίεσης. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από βιομάζα μικροφυκών, όπως αποδεικνύεται για την εκχύλιση ασταξανθίνη από *H. pluvialis* χρησιμοποιώντας CXE (Reyes F. A. et al., 2014).

Τέλος, η ενσωμάτωση της προηγμένης τεχνολογίας SCF-CO<sub>2</sub> στα βιοδιυλιστήρια για την παραγωγή βιοκαυσίμων από υπολειμματική βιομάζα θα μπορούσε να οδηγήσει σε ελπιδοφόρες τεχνολογίες για την επεξεργασία βιομάζας μικροφυκών για ενώσεις υψηλής προστιθέμενης αξίας και βιοκαύσιμα (Poojary M.M. et al, 2016).

#### 3.3.4. Νέες προσεγγίσεις στις τεχνικές χρωματογραφίας

Η προπαρασκευαστική χρωματογραφία είναι μια ισχυρή μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλασματοποίηση και τον καθαρισμό εκχυλισμάτων λιπιδίων μικροφυκών καθώς και εκχυλίσματα πολυφαινολών και χρωστικών πριν από την αναλυτική χρωματογραφία. Η προπαρασκευαστική χρωματογραφία, ωστόσο, έχει εφαρμοστεί ελάχιστα στα μικροφύκη. Ορισμένες μελέτες αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της

προπαρασκευαστικής χρωματογραφίας για την απομόνωση πεπτιδίων από *Spirulina Plantensis* (Hu S. et al., 2019), ο διαχωρισμός των χρωστικών από *Nitzschia laevis* (Sun P. et al., 2019) ή κλασματοποίηση πολυφαινολών από *Chlamydomonas sp. KSF108* (Khanh Tran H. N. et al., 2019). Οι πολυδιάστατες προπαρασκευαστικές χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η αέρια χρωματογραφία ή υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με σύστημα φασματομετρία μάζας MS αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την απομόνωση και ταυτοποίηση νέων ουσιών μετά από τις εκχυλίσσεις που πραγματοποιούνται σε βιομάζα μικροφυκών. Η χρωματογραφία αντίθετου ρεύματος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε μικροφύκη για τον διαχωρισμό χρωστικών ουσιών και πολυφαινολών (Li et al., 2006).

Μια άλλη αναδυόμενη τεχνική χρωματογραφίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα για καθαρισμό προϊόντων είναι η Expanded Bed Adsorption (EBA) χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την απομόνωση φυκοερυθρίνης από το *Porphyridium cruentum* με χρήση διμεθυλαμινοαιθυλοκυτταρίνης (DEAE-c) ως ρητίνης (Bermejo R. et al., 2003). Η υπερκρίσιμη υγρή χρωματογραφία (SFC) είναι σχετικά πρόσφατη τεχνική χρωματογραφίας με τη διαφορά από άλλες χρωματογραφικές τεχνικές να είναι η χρήση ενός υπερκρίσιμου υγρού ως κινητή φάση. Αυτό έχει ως πλεονέκτημα τη μείωση σε απαιτήσεις διαλύτη και σε χρόνο διατήρησης στη στήλη, ενώ παράλληλα είναι σε θέση να αναλύσει θερμοευαίσθητες ενώσεις που η GC δεν μπορεί (Ajila C. M. et al., 2011). Στη SFC γίνεται χρήση στήλης C18 και 2-αιθυλοπυριδίνης και χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση καρτενοειδών σε εκχυλίσματα του *Scenedesmus sp.* (Zoccali M. et al., 2019).

## Κεφάλαιο 4: Αξιολόγηση βιοδραστικότητας μικροφυκών και μηχανισμοί δράσης

Με γνώμονα την αυξανόμενη ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αυξανόμενης παραγωγής και της υψηλής διατροφικής τους αξίας. Τα μικροφύκη είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφα και περιέχουν μεγάλο πλήθος διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων βιοδραστικών πεπτιδίων, PUFAs, βιταμινών, φαινολών, καροτενοειδών, στερολών κ.λπ. όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 2. Οι βιοδραστικές ενώσεις των μικροφυκών παρουσιάζουν σημαντική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση. Στο μεταξύ, διεξάγονται έρευνες αναφορικά με τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των ενώσεων. Μέχρι σήμερα, οι εφαρμογές στοχεύουν κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων και υδατοκαλλιέργειας, ενώ οι βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών και βιοκαυσίμων επιδιώκουν να χρησιμοποιήσουν ακόμα περισσότερα συστατικά μικροφυκών. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν εμπόδια στην εμπορική εφαρμογή των μικροφυκών λόγω της μη αναπτυγμένης τεχνολογίας και του υψηλού κόστους παραγωγής (Zhou L. et al., 2022).

### 4.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται το βιολογικό μόριο που προστατεύει τον οργανισμό από οξειδωτικές διεργασίες υπό την επίδραση ελεύθερων ριζών (Scaglioni P. et al., 2018). Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ενεργά στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Τα μικροφύκη, ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, εκτίθενται συχνά σε δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), με αποτέλεσμα να μπορούν να συσσωρεύουν διάφορα αντιοξειδωτικά σύμπλοκα αναπτύσσοντας, έτσι, έναν μηχανισμό προστασίας των κυττάρων από τη δράση των ελεύθερων ριζών. Η μεγάλη ποικιλία ειδών, η δυνατότητα διαμόρφωσης της ανάπτυξης και η απλότητα της καλλιέργειας των μικροφυκών μπορούν να θεωρηθούν ως ένας από τους πολλά υποσχόμενους φυσικούς πόρους για την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η ζήτηση για ενώσεις φυσικής προέλευσης αυξάνεται ραγδαία, καθώς οι συνθετικά παραγόμενες αντίστοιχες ουσίες μπορεί να είναι τοξικές και ακατάλληλες για ανθρώπινη κατανάλωση (Cezare-Gomes E.A. et al., 2019). Συνεπώς, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που παράγονται από μικροφύκη αποκτούν εμπορικό ενδιαφέρον ως πιθανά φυσικά προϊόντα υγείας.



Το οξειδωτικό στρες που μπορεί να προκληθεί από την οξύτητα, τα μέταλλα, την υπεριώδη ακτινοβολία και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών από πολλά είδη φωτοσυνθετικών πράσινων μικροφυκών και γαλαζοπράσινων φυκών (Gauthier, M. R. et al., 2020). Κάθε είδος μικροφυκών ανταποκρίνεται διαφορετικά σε κάθε καταπόνηση, αποδίδοντας αύξηση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ή/και αύξηση των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών, όπως τα καροτένια, οι ξανθοφύλλες και τα φλαβονοειδή (Gauthier, M. R. et al., 2020). Από τα αντιοξειδωτικά που παράγονται ευρέως από μικροφύκη, το β-καροτένιο, η ασταξανθίνη και η λουτεΐνη είναι αυτά με την κυριότερη παρουσία στην αγορά (Sun X.-M. et al., 2018).

Η ανάπτυξη των μικροφυκών επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα μέταλλα, το pH, η υπεριώδης ακτινοβολία και η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων (Chokshi K. et al., 2017) καθώς και από άλλους αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση πολύτιμων μεταβολιτών στα μικροφύκη, όπως είναι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις (Πίνακας 4.1.1.) (Paliwal C. et al., 2017). Η διαταραχή του ισοζυγίου μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων προκαλεί μια κατάσταση γνωστή ως οξειδωτικό στρες (Kehrer J.P., 2000). Συνέπεια αυτού είναι τα μικροφύκη να παράγουν πολύτιμους δευτερογενείς αμυντικούς μεταβολίτες με αντιοξειδωτικό δυναμικό για να αντισταθμίσουν αυτή την ανισορροπία (Li H.B. et al., 2007).

**Πίνακας 4.1.1.:** Αντιοξειδωτικές ενώσεις με αυξημένη παραγωγή από μικροφύκη υπό οξειδωτικό στρες (Gauthier, M. R. et al., 2020).

Αντιοξειδωτικός τύπος	Αντιοξειδωτική ουσία	Συνθήκη στρες	Είδος μικροφύκους	Παράμετροι στρες	Παραγωγικότητα/δράση υπό έλεγχο	Παραγωγικότητα/δράση υπό στρες
Ενζυμικός	Ασκορβική υπεροξειδάση (APX)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella</i>	Copper - 25 $\mu\text{M}$ for 7 Days	<0.2 $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1a}$	<0.8 $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1a}$
			<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Copper - 50 $\mu\text{M}$ for 7 days	<0.6 $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1a}$	>1.0 $\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1a}$
		Αλατότητα	<i>Scenedesmus sp.</i>	200 mM for 15 days	100% <sup>a</sup>	233.1% <sup>a</sup>
			<i>CCNM 1077</i>	2-Stage 400 mM after 9 days of 15	100% <sup>a</sup>	311.9% <sup>a</sup>
Καταλάση (CAT)	Έκθεση σε μέταλλα		<i>Pavlova viridis</i>	Copper - 3 $\text{mg L}^{-1}$ for 14 days	<150 U 106 cells <sup>-1a</sup>	>500 U 106 cells <sup>-1a</sup>
			<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Copper - 414 $\mu\text{M}$ for 7 days	<100 U $\text{mg}^{-1} \text{ protein}$	>150 U $\text{mg}^{-1} \text{ protein}^a$
		Περιορισμός θρεπτικών συστατικών	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Nitrogen starvation for 3 days	24.7 U $\times 103 \text{ mg}^{-1} \text{ protein}^a$	54.1 U $\times 103 \text{ mg}^{-1} \text{ protein}^a$

	Μεταβολή pH	<i>Spirulina platensis</i>	pH 7.5 from 9.0 for 14 days	2.8 U mg <sup>-1</sup> proteina	4.1 U mg <sup>-1</sup> proteina
	UV-B ακτινοβολία	<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (3 <sup>rd</sup> day of exposure)	<30 U mg <sup>-1</sup> proteina	63 U mg <sup>-1</sup> proteina
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Pavlova viridis</i>	Copper - 3 mg L <sup>-1</sup> for 14 days	<1000 U 106 cells <sup>-1</sup> a	>14,000 U 106 cells <sup>-1</sup> a
Υπεροξειδάση (POD)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Copper - 50 μM for 7 days	<2.0 μmol oxi. Pyrogallol mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup>	>3.0 μmol oxi. Pyrogallol mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup> a
	Μεταβολή pH	<i>Spirulina platensis</i>	pH 7.5 from 9.0 for 14 days	21.0 U mg <sup>-1</sup> proteina	30.5 U mg <sup>-1</sup> proteina
	UV-B ακτινοβολία	<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (3 <sup>rd</sup> day of exposure)	<30 U mg <sup>-1</sup> proteina	141 U mg <sup>-1</sup> proteina
Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella Sorokiniana</i>	Copper - 25 μM for 7 Days	<75 U mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup> a	>125 U mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup> a
		<i>Pavlova viridis</i>	Copper - 3 mg L <sup>-1</sup> for 14 days	<20,000 U 106 cells <sup>-1</sup> a	>40,000 U 106 cells <sup>-1</sup> a

			<i>Chlorella vulgaris</i>	Copper - 3 mg L <sup>-1</sup> for 72 h	<100 mmol nitrate mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup> 1a	>140 nmol nitrate mg <sup>-1</sup> protein min <sup>-1</sup> 1a
			<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Copper - 414 μM for 7 days	<0.15 U mg <sup>-1</sup> proteina	>0.25 U mg <sup>-1</sup> proteina
		Περιορισμός θρεπτικών συστατικών	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Nitrogen starvation for 2 days	687.3 U mg <sup>-1</sup> proteina	3857.9 U mg <sup>-1</sup> proteina
		Μεταβολή pH	<i>Spirulina platensis</i>	pH 10.5 from 9.0 for 14 days	10.2 U mg <sup>-1</sup> proteina	12.5 U mg <sup>-1</sup> proteina
		UV-B ακτινοβολία	<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (4 <sup>th</sup> day of exposure)	<0 U mg <sup>-1</sup> proteina	107 U mg <sup>-1</sup> proteina
<b>Μη ενζυμικός</b>	Ασκορβικό οξύ (AA)	Περιορισμός θρεπτικών συστατικών	<i>Chlorella vulgaris</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<1.0 mg g <sup>-1</sup> DW	>1.0 mg g <sup>-1</sup> DW
			<i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<1.0 mg g <sup>-1</sup> DW	>1.5 mg g <sup>-1</sup> DW

			Nitrogen limitation 0.2 mM for 5 days	<1.0 mg g <sup>-1</sup> DW	>1.0 mg g <sup>-1</sup> DW
		<i>Tetraselmis suecica</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<2.0 mg g <sup>-1</sup> DW	>5 mg g <sup>-1</sup> DW
			Nitrogen limitation 0.2 mM for 5 days	<2.0 mg g <sup>-1</sup> DW	>3 mg g <sup>-1</sup> DW
UV-B ακτινοβολία		<i>Chlorella vulgaris</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 4 h	<5 mM g <sup>-1</sup> FW	>5 mM g <sup>-1</sup> FW
		<i>Chlorococcum humicola</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 4 h	<10 mM g <sup>-1</sup> FW	>15 mM g <sup>-1</sup> FW
Ασκορβικό (AsA)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Copper - 25 μM for 7 days	<0.3 μmol g <sup>-1</sup> FW	>0.3 μmol g <sup>-1</sup> FW
UV-B ακτινοβολία		<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (5 <sup>th</sup> day of exposure)	<60 μmol g <sup>-1</sup> w. wt	20.3 μmol g <sup>-1</sup> w. wt.

Καροτενοειδή	Ένταση φωτός	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 20 days	<40 mg L <sup>-1</sup> culture	>50 mg L <sup>-1</sup> culture
	Θερμοκρασία	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	40 °C for 20 days	<40 mg L <sup>-1</sup> culture	>40 mg L <sup>-1</sup> culture
	UV-A ακτινοβολία	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 15 days	<50 mg L <sup>-1</sup> culture	>50 mg L <sup>-1</sup> culture
	UV-B ακτινοβολία	<i>Chlorella vulgaris</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 1 h	0.98 mg g <sup>-1</sup> FW	1.18 mg g <sup>-1</sup> FW
		<i>Chlorococcum humicola</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 1 h	1.02 mg g <sup>-1</sup> FW	1.36 mg g <sup>-1</sup> FW
Γλουταθειόνη (GSH)	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Pavlova viridis</i>	Copper - 3 mg L <sup>-1</sup> for 14 days	<17.5 mg 106 cells <sup>-1</sup>	>35 mg 106 cells <sup>-1</sup>
			Zinc - 6.5 mg L <sup>-1</sup> for 14 days	<125 mg 103 cells	>175 mg 103 cells <sup>-1</sup>
		<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Copper - 414 $\mu\text{M}$ for 7 days	<1.0 nmol 106 cells <sup>-1</sup>	>12.5 nmol 106 cells <sup>-1</sup>
	UV-B ακτινοβολία	<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (6 <sup>th</sup> day of exposure)	435 nmol g <sup>-1</sup> w wt.	531 nmol g <sup>-1</sup> w wt

Αμινοξέα που μοιάζουν με τη μυκοσπορίνη (MAA)	UV-B ακτινοβολία	<i>Dunaliella salina</i>	13.2 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> (2 <sup>nd</sup> day of exposure)	<4 μmol g <sup>-1</sup> w. wt.	10.5 μmol g <sup>-1</sup> w. wt
Πολυφαινόλες	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella</i>	Copper - 25 μM for 7 Days	<6.0 gallic acid equivalent (mg g <sup>-1</sup> FW)	>9.0 gallic acid equivalent (mg g <sup>-1</sup> FW)
		<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Copper - 50 μM for 7 days	<6.0 gallic acid equivalent (mg g <sup>-1</sup> FW)	>9.0 gallic acid equivalent (mg g <sup>-1</sup> FW)
	Περιορισμός θρεπτικών συστατικών	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Nitrogen starvation for 2 days	143.5 μg g <sup>-1</sup> FW	246.8 μg g <sup>-1</sup> FW
	Μεταβολή pH	<i>Spirulina platensis</i>	pH 9.5 from pH 9.0 for 14 days	<10 gallic acid equivalents (mg g <sup>-1</sup> DW)	>12 gallic acid equivalents (mg g <sup>-1</sup> DW)
Προλίνη	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella</i>	Copper - 25 μM for 7 Days	<10.0 μmol g <sup>-1</sup> FW	>20.0 μmol g <sup>-1</sup> FW
		<i>Scenedesmus Acuminatus</i>	Copper - 50 μM for 7 Days	<10.0 μmol g <sup>-1</sup> FW	>60 μmol g <sup>-1</sup> FW

		<i>Chlorella vulgaris</i>	Copper - 3 mg L <sup>-1</sup> for 72 h	2.1 nmol proline mg <sup>-1</sup> protein	12.1 nmol proline mg <sup>-1</sup> protein
Περιορισμός θρεπτικών συστατικών		<i>Acutodesmus dimorphus</i>	N-starvation for 2 days	15.1 μM g <sup>-1</sup> DW	71.5 μM g <sup>-1</sup> DW
Αλατότητα		<i>Scenedesmus sp.</i>	400 mM for 15 days	29.2 μM g <sup>-1</sup> DW	131.5 μM g <sup>-1</sup> DW
		<i>CCNM 1077</i>	2-Stage 400 mM after 9 days of 15	31.35 μM g <sup>-1</sup> DW	73.5 μM g <sup>-1</sup> DW
UV-B ακτινοβολία		<i>Chlorella vulgaris</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 4 h	<0.04 mM g <sup>-1</sup> FW	>0.12 mM g <sup>-1</sup> FW
		<i>Chlorococcum humicola</i>	15 W m <sup>-2</sup> for 4 h	<0.06 mM g <sup>-1</sup> FW	>0.12 mM g <sup>-1</sup> FW
Τοκοφερόλες	Έκθεση σε μέταλλα	<i>Chlorella Sorokiniana</i>	Copper - 25 μM for 7 Days	<3.0 μg g <sup>-1</sup> FW	>3.0 μg g <sup>-1</sup> FW
		<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Copper - 50 μM for 7 days	<1.5 μg g <sup>-1</sup> FW	>1.5 μg g <sup>-1</sup> FW



---

Περιορισμός θρεπτικών συστατικών	<i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<0.4 mg g <sup>-1</sup> DW	>0.6 mg g <sup>-1</sup> DW
	<i>Phaeodactylum</i> <i>Tricornutum</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<0.2 mg g <sup>-1</sup> DW	>0.2 mg g <sup>-1</sup> DW
	<i>Tetraselmis</i> <i>suecica</i>	Phosphorus limitation 0.01 mM for 5 days	<0.2 mg g <sup>-1</sup> DW	>0.2 mg g <sup>-1</sup> DW

---

Υπάρχει η δυνατότητα εκμετάλλευσης του οξειδωτικού στρες για την αναβάθμιση της παραγωγής συγκεκριμένων επιθυμητών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Μια καλλιέργεια υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση μετάλλων, υψηλή ηλιακή ακτινοβολία ή/και περιορισμούς θρεπτικών συστατικών) έχει τη δυνατότητα να είναι ωφέλιμη για τον μετριασμό της πιθανής μόλυνσης από ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς (Goiris K. et al., 2015).

Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων ως αντιοξειδωτικών στα μικροφύκη παραμένει άγνωστος. Μελέτη του Gürlek et al. αξιολόγησε την αντιοξειδωτική δράση ορισμένων φαινολικών ενώσεων που ελήφθησαν από εκχυλίσματα μικροφυκών *Galderia sulphuraria*, *Neochloris texensis*, *Stichococcus bacillaris*, *Ettlia carotinoso*, *Chlorella minutissima*, *Schizochytrium limacinum*, *Cryptocodinium cohnii* και *Chlorella vulgaris* (Gürlek, C. et al., 2020). Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση και η μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις ανιχνεύθηκαν στο εκχύλισμα *Galderia sulphuraria*. Συνεπώς, διαπιστώθηκε υψηλός συντελεστής συσχέτισης μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις και βάση αυτού του πορίσματος προκύπτει η υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση των μικροφυκών μπορεί να οφείλεται στην παρουσία φαινολικών ενώσεων.

Αναφορικά με τα καροτενοειδή που προέρχονται από φυσικές πηγές προτιμώνται για τη μεγαλύτερη καταλληλότητά τους για ανθρώπινη κατανάλωση και την υψηλότερη αντιοξειδωτική τους ικανότητα, ωστόσο τα λιγότερο ακριβά συνθετικά παραγόμενα καροτενοειδή αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα της παγκόσμιας αγοράς καροτενοειδών (Novoveska L. et al., 2019). Καθώς υπάρχει αυξανόμενη επιθυμία των καταναλωτών για φυσικά παραγόμενα αντιοξειδωτικά, απαιτείται επιστημονική έρευνα με σκοπό την αναζήτηση και την εκμετάλλευση μικροφυκών. Επιπρόσθετα, τα βιοδραστικά πεπτίδια που λαμβάνονται μετά από υδρόλυση πρωτεϊνών μπορούν να έχουν διάφορες ευεργετικές επιδράσεις (Hu, X. et al., 2015).

Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν διερευνήσει την αντιοξειδωτική δράση βιοδραστικών ενώσεων από διάφορα μικροφύκη. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* και *Isochrysis galbana clone Tahiti*, τα οποία παρουσίασαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση με τα *Dunaliella salina* και *Tetraselmis chuii* να παρουσιάζουντα καλύτερα αποτελέσματα (Widowati I. et al., 2017). Επίσης, έχει εξετασθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό εκχυλισμάτων που ελήφθησαν με τη χρήση υπερήχων από τα μικροφύκη *Chlorella* και *Spirulina* όπου διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα των υπό μελέτη μικροφυκών ως πηγές φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι καταλληλότερα για χρήση ως συστατικό τροφίμων (Agregán R. et al., 2018). Ακόμα, έχει αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση διαφόρων εκχυλισμάτων από τα μικροφύκη *Scenedesmus subspicatus* τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Bacillus subtilis* (Dantas, D.M.d.M. et al., 2019). Επιπλέον, έχει αναλυθεί η βιολογική δραστηριότητα

του υδατικού-αλκοολικού εκχυλίσματος του μικροφύκου *Tetraselmis suecica*, το οποίο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις καροτενοειδών κι έχει προκύψει υψηλή αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος (Sansone, C. et al., 2017).

## 4.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Η αντιμικροβιακή δράση των μικροφυκών έχει αποδοθεί σε ενώσεις που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, που περιλαμβάνουν ινδόλια, τερπένια, φαινόλες, λιπαρά οξέα και πτητικούς αλογονωμένους υδρογονάνθρακες (Cardozo KHM et al., 2007).

### 4.2.1. Αντιβακτηριακές ιδιότητες

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων βακτηρίων έναντι ενός σημαντικού αριθμού αντιβιοτικών, έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία τις τελευταίες δεκαετίες και έχει εντείνει τις προσπάθειες ανακάλυψης νέων αντιβακτηριακών ουσιών. Ορισμένα είδη βακτηρίων προκαλούν σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων τροφιμογενών ασθενειών. Η εργασία του Pratt το 1944, κατέδειξε τη δραστηριότητα του πράσινου φύκου *Chlorella* έναντι διαφόρων θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Pratt R. et al., 1944), αυξάνοντας το ενδιαφέρον για την εύρεση αντιβακτηριακών ενώσεων από μικροφύκη. Την έρευνα του Pratt ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες για την εύρεση ενώσεων με αντιβακτηριακή δράση στα μικροφύκη, με εφαρμογή στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά των βακτηριακών λοιμώξεων και στην ανάπτυξη πρόσθετων για τη συντήρηση τροφίμων (Falaise C. et al., 2016).

Πολυάριθμα είδη μικροφυκών από διαφορετικές ταξινομικές ομάδες που προέρχονται από διάφορες περιοχές, κυρίως από το θαλάσσιο περιβάλλον, αλλά και από το περιβάλλον γλυκού νερού ή ακόμη και από το έδαφος, αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Falaise C. et al., 2016). Στον Πίνακα 4.2.1. παρουσιάζονται τα μικροφύκη με την υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση.

**Πίνακας 4.2.1.:** Αντιβακτηριακή δράση από μικροφύκη έναντι ανθρώπινων παθογόνων βακτηρίων (Falaise, C. et al., 2016).

Είδη μικροφυκών	Αντιβακτηριακές ενώσεις	Αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων Gram+	Αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων Gram-
<b>Πράσινα μικροφύκη</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Χλωρελλίνη	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>

<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>	Υδατικά ή μεθανολικά και εξανολικά εκχυλίσματα	<i>B. subtilis, S. aureus, S. epidermidis</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa, S. typhi</i>
<b><i>Dunaliella salina</i></b>	Ινδολικό παράγωγο, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, β-ιονόνη και νεοφυταδιένιο	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>
<b><i>Dunaliella sp.</i></b>	Λυμένα κύτταρα	<i>S. epidermidis, Micrococcus luteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b><i>Chlorococcum HS-101</i></b>	α-λινολενικό οξύ	<i>B. subtilis, Bacillus cereus, S. aureus, MRSA</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b><i>Haematococcus pluvialis</i></b>	Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<b><i>Scenedesmus obliquus</i></b>	Λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa, Salmonella sp.</i>
<b><i>Scenedesmus quadricauda</i></b>	Διάφορα εκχυλίσματα με οργανικούς διαλύτες	<i>B. subtilis, S. aureus</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>	Αιθανολικά εκχυλίσματα	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>
<b>Ερυθρά μικροφύκη</b>			
<b><i>Porphyridium purpureum</i></b>	Μεθανολικά εκχυλίσματα	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<b><i>Porphyridium sordidum</i></b>	Pellet	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli, Pseudomonas fluorescens</i>
<b>Διάτομα</b>			
<b><i>Asterionella glacialis</i></b>	Ολόκληρο κύτταρο	<i>S. aureus, S. epidermidis, M. luteus, Sarcina sp.</i>	<i>E. coli</i>
<b><i>Chaetoceros muelleri</i></b>	Λιπιδικά κλάσματα που περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα	<i>B. subtilis, S. aureus</i>	<i>E. coli</i>

<b><i>Navicula delognei</i></b> <b>(<i>Parlibellus delognei</i>)</b>	εστέρας τρανσφυτόλης, εξαδεκατετραενοϊκό και οκταδεκατετραενοϊκό οξύ	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium, P. vulgaris</i>
<b><i>Rhizosolenia alata</i></b>	Διάφορα εκχυλίσματα με οργανικό διαλύτη	<i>B. subtilis, S. aureus</i>	<i>E. coli, P. aeruginosa, P. vulgaris, S. typhi, V. cholerae</i>
<b><i>Skeletonema costatum</i></b>	Υδατικά και οργανικά εκχυλίσματα	<i>B. subtilis, S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>

Από τις μελέτες προκύπτει ότι η παραγωγή αντιβιοτικών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των μικροφυκών (Bhagavathy S. et al., 2011). Η παρουσία αντιβιοτικών παραγόντων μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ διαφορετικών ειδών της ίδιας κατηγορίας, αλλά μπορεί να διαφέρει και εντός του ίδιου είδους, με οικοτύπους προσαρμοσμένους σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Pawlik-Skowrońska, B. et al. 2003).

#### 4.2.2. Αντιμυκητιασικές ιδιότητες

Η αναζήτηση αντιμυκητιασικών ενώσεων από μικροφύκη ξεκίνησε πολύ αργότερα από την έρευνα για αντιβακτηριακή δράση. Στην πραγματικότητα, οι μύκητες θεωρούνται επιβλαβή ανθρώπινα παθογόνα από τη δεκαετία του 1970, όταν αυξήθηκε η θνησιμότητα που προκαλούνταν από μυκητιασικές λοιμώξεις και η συχνότητα των νοσοκομειακών μυκητιάσεων σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Η αύξηση των μυκητιασικών λοιμώξεων οφειλόταν κυρίως σε θεραπείες που καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών, όπως η χρήση εντατικών και επιθετικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων, η επέκταση των προγραμμάτων μεταμόσχευσης οργάνων και η εξάπλωση της επιδημίας του AIDS (Alangaden G.J., 2011). Η αυξανόμενη χρήση αντιμυκητιασικών παραγόντων τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για νέα φάρμακα και έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για την εύρεση μυκητοκτόνου δράσης από φυσικά θαλάσσια προϊόντα έναντι παθογόνων μυκήτων του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων αντιμυκητιασικών παραγόντων από μικροφύκη (Πίνακας 4.2.2.) (Falaise, C. et al., 2016).

Πίνακας 4.2.2.: Αντιμυκητιακή δράση από μικροφύκη (Falaise, C. et al., 2016).

Είδη μικροφυκών	Αντιμυκητιασικές ενώσεις	Μικροοργανισμοί-στόχοι
<b>Πράσινα μικροφύκη</b>		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Υπερκείμενο υγρό από μικροφύκη	Ζυμομύκητας: <i>Candida kefyr</i> Μούχλες <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nige</i>
<i>Chlorococcum humicola</i>	Εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών και χρωστικές ουσίες: β-καροτένιο, α-χλωροφύλλη & β-χλωροφύλλη	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i> Μούχλες: <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Υπερκείμενο υγρό από μικροφύκη	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Εκχυλίσματα με οργανικό διαλύτη	Ζυμομύκητες: <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> Μούχλες: <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. herquei</i> Other: <i>A. brassicae</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Helminthosporium sp.</i>
<b>Ερυθρά μικροφύκη</b>		
<i>Porphyridium aeruginum</i>	Φυκοπιλοπρωτεΐνες	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<i>Porphyridium purpureum</i>	Υπερκείμενο υγρό από μικροφύκη	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<i>Rhodella reticulata</i>	Εξωπολυσακχαρίτες	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<b>Διάτομα</b>		
<i>Chaetoceros lauderi</i>	Πολυσακχαρίτες	Μούχλες: <i>A. fumigatus</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Emmonsia parva</i> , <i>Madurella mycetomi</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> Δερματοφύκη: <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum audouini</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum ferrugineum</i> , <i>Microsporum gypseum</i> ,

		<i>Microsporium nanum</i> , <i>Microsporium persicolor</i> , <i>Trichophyton spp.</i>
<b><i>Chaetoceros muelleri</i></b>	Λιπιδικά κλάσματα: τριγλυκερίδια, δοκοσαπεντανοϊκό οξύ (DPA)	Ζυμομύκητας: <i>C. albicans</i>
<b><i>Haslea karadagensis</i></b>	Καθαρισμένη χρωστική ουσία (ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές μορφές)	<i>Corollospora maritima</i> , <i>Lulworthia sp.</i> , <i>Dendryphiella salina</i>
<b><i>Thalassiothrix frauenfeldii</i></b>	Διηθήματα καλλιέργειας και εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών	Ζυμομύκητες: <i>C. albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> Μούχλα: <i>A. niger</i>
<b>Δινομαστιγωτά</b>		
<b><i>Amphidinium sp.</i></b>	Πολυόλες: Karatungiols A(1)	Μούχλα: <i>A. niger</i>
<b><i>Goniodoma pseudogonyaulax</i></b>	Goniodomin A (πολυαιθερικό μακρολίδιο)	Ζυμομύκητες: <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. cerevisiae</i> Μούχλες: <i>Penicillium sp.</i> Dermatophyte: <i>T. mentagrophytes</i>
<b><i>Prorocentrum lima</i></b>	Πολυαιθέρες	Ζυμομύκητας: <i>Candida rugosa</i> Μούχλες: <i>A. niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>

Η αντιμυκητιασική δράση ποικίλλει ανάλογα με το είδος των μικροφυκών, τον τύπο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση της ένωσης και τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Δεν φαίνεται να υπάρχει ταξινομική τάση για την αντιμυκητιασική δράση και η ικανότητα παραγωγής αντιμυκητιασικών ενώσεων θα μπορούσε να έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα από τη φυλογενετική σχέση στα μικροφύκη (Mudimu O., et al., 2014). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί μια σημαντική δραστηριότητα του γένους *Chaetoceros* και έχει αναφερθεί επίσης ότι τα θαλάσσια μικροφύκη παρουσιάζουν

περισσότερες δυνατότητες στην αναζήτηση νέων αντιμυκητιασικών παραγόντων από ό,τι τα είδη του γλυκού νερού (Kellam, S.J. et al., 1988).

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2.2. έχουν χαρακτηριστεί αρκετές αντιμυκητιασικές ενώσεις από διάφορα μικροφύκη.

#### 4.2.3. Αντιικές ιδιότητες

Οι ιογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν την κύρια αιτία ανθρώπινων ασθενειών και θνησιμότητας παγκοσμίως. Οι θεραπείες κατά των ασθενειών που προκαλούνται από ιούς είναι περιορισμένες και η ανθεκτικότητα σε αυτές τις διαθέσιμες θεραπείες καταδεικνύει την ανάγκη εύρεσης νέων φαρμάκων (Yasuhara-Bell J. & Lu Y., 2010). Πολλά φάρμακα προέρχονται από συνθετικές οργανικές χημικές ουσίες ή από φυσικά προϊόντα, για παράδειγμα δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών (Kitazato K. et al., 2007). Παράλληλα με την ανάπτυξη της "μπλε" τεχνολογίας και τη βελτίωση της εκχύλισης, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις αντιικές ενώσεις που προέρχονται από τη θάλασσα. Έτσι, έχουν ελεγχθεί χιλιάδες ενώσεις από διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως φύκη, βακτήρια, μύκητες, θαλάσσια ασπόνδυλα ή σφουγγάρια και ορισμένες από αυτές έχουν επιδείξει αντιικές δράσεις και είναι διαθέσιμες στο εμπόριο (Falaise C. et al., 2016).

Πιθανή αντιική δράση από ενώσεις φυκών καταδείχθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950, που παρατηρήθηκε ότι οι πολυσακχαρίτες που εξήχθησαν από το *Gelidium cartilagenium* παρείχαν προστασία για τα εμβρυακά αυγά έναντι των ιών της γρίπης Β και της παρωτίτιδας (Gerber P. et al., 1958), ενώ οι πρώτες μελέτες με βάση τον γόνο των φυκών για τις αντιικές ουσίες τους ξεκίνησαν τη δεκαετία του 1970 (Falaise C. et al., 2016). Τα κυανοβακτήρια είναι πολλά υποσχόμενες πηγές αντιικών ενώσεων και οι απλές συνθήκες ανάπτυξής τους τα καθιστούν «καλούς υποψήφιους» για την παραγωγή αντιικών παραγόντων σε βιομηχανική κλίμακα (Vijayakumar S. & Menakha M., 2015). Ο θειούχος πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε από το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis*, με την ονομασία spirulan, έχει επιδείξει ισχυρή αντιική δράση έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1) και επίσης έναντι του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) (Hayashi, T. et al., 1996).

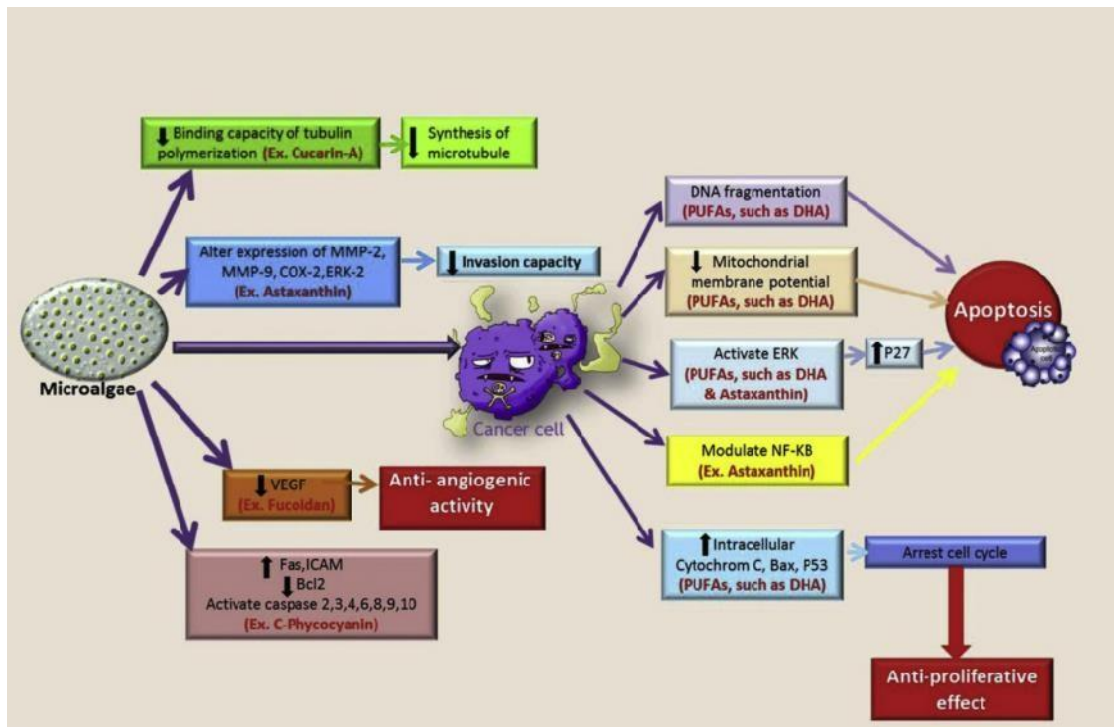
Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τη δοκιμή ενώσεων μικροφυκών έναντι παθογόνων ανθρώπινων ιών. Οι αντιικές ενώσεις που εξάγονται από τα μικροφύκη είναι κυρίως πολυσακχαρίτες. Οι μηχανισμοί δράσης τους δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένοι, αλλά φαίνεται ότι μπορούν να αναστείλουν διάφορα στάδια της ιογενούς μόλυνσης, όπως η προσκόλληση, η διείσδυση ή ο πολλαπλασιασμός. Οι πολυσακχαρίτες έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της βιοϊατρικής και της



φαρμακευτικής βιομηχανίας, καθώς είναι εύκολα διαθέσιμοι στη φύση και οι περισσότεροι από αυτούς είναι μη τοξικοί, ασφαλείς, βιοδιασπώμενοι και βιοσυμβατοί (Ahmadi A. et al. 2015).

### 4.3 Αντικαρκινική δράση

Ένας τομέας στον οποίο απαιτούνται νέα θεραπευτικά μέσα είναι η θεραπεία του καρκίνου που εδώ και δεκαετίες αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για την ιατρική και την κτηνιατρική. Καθώς η θεραπεία του καρκίνου συχνά προκαλεί σοβαρές παρενέργειες και καθίσταται αναποτελεσματική λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα φάρμακα, απαιτούνται νέοι θεραπευτικοί παράγοντες. Πολλά φυτά, βακτήρια, μύκητες και συνθετικές ενώσεις έχουν μελετηθεί προκειμένου να εντοπιστούν ουσίες με αντικαρκινική δράση. Τα φύκη, ιδίως τα μικροφύκη, φαίνεται να αποτελούν μια από πλέον ελπιδοφόρες κατηγορίες για την εύρεση αποτελεσματικών αντικαρκινικών ουσιών. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι οι αντικαρκινικές ιδιότητες ορισμένων ενώσεων που προέρχονται από φύκη διαμορφώνουν διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς, όπως η κυτταρική κυτταροτοξικότητα (η ικανότητα θανάτωσης άλλων κυττάρων, που είναι ένας σημαντικός μηχανισμός δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος για την καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων και του καρκίνου), η μείωση της εισβολής των καρκινικών κυττάρων και η ενίσχυση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (Lee J.C. et al., 2013) (Εικόνα 4.3.1.).



**Εικόνα 4.3.1.:** Πιθανοί κυτταρικοί μηχανισμοί για την αντικαρκινική δράση των μικροφυκών και ο πιθανός ρόλος των συμμετεχόντων μορίων (Abd El-Hack, M. E et al., 2019).

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει τις αντικαρκινικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων από μικροφύκη. Τόσο από πηγές αλμυρού όσο και από πηγές γλυκού νερού, έχει βρεθεί ότι τα εκχυλίσματα μικροφυκών αναστέλλουν την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Τα θαλάσσια διάτομα περιέχουν υδατοδιαλυτές ενώσεις που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα λευχαιμίας μέσω απόπτωσης και αυτοφαγίας (Prestegard S. K. et al., 2009), ενώ βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης των μικροφυκών γλυκού νερού της Ανταρκτικής *Micractinium sp.* και *Chloromonas reticulata* καταστέλλουν την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου καθώς και την έκφραση προφλεγμονωδών μεσολαβητών στα μακροφάγα (Suh S. S. et al., 2019). Η αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την παραγωγή μεταβολιτών (Prestegard S. K. et al., 2014) και μπορεί επίσης να επηρεάσει το αποτέλεσμα των εκχυλισμάτων μικροφυκών στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το *Skeletonema marinoi* έδειξε αντικαρκινική δράση έναντι ανθρώπινων κυττάρων μελανώματος (Lauritano C. et al., 2016), ενώ η μεταβολή των συνθηκών φωτός και θερμοκρασίας επηρέασε την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων θαλάσσιων διατόμων (Ingebrigtsen R. A. et al., 2016). Και στις δύο περιπτώσεις, οι μεταβολίτες σε αυτά τα εκχυλίσματα μικροφυκών εμποδίζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου, για παράδειγμα μέσω της αναστολής του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (Lauritano C. et al., 2016; Ingebrigtsen R. A. et al., 2016).

Τα καρτενοειδή είναι, επίσης, μια δημοφιλής ομάδα αντικαρκινικών ουσιών που απομονώνονται από μικροφύκη. Τα καρτενοειδή που απομονώνονται από το θαλάσσιο *C. ellipsoidea* και το *C. vulgaris* του γλυκού νερού έχουν δείξει αντιπολλαπλασιαστική δράση (Kwang H. C. et al., 2008). Το κύριο καρτενοειδές από το *C. ellipsoidea* είναι η βιολαξανθίνη και οι άλλες δύο δευτερεύουσες ουσίες είναι οι ξανθοφύλλες ανθεραξανθίνη και ζεαξανθίνη, ενώ το κύριο καρτενοειδές από το *C. vulgaris* είναι η λουτεΐνη (Bratchkova, A. & Kroumon, A. D., 2020). Τα εκχυλίσματα και από τα δύο είδη παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Bratchkova, A. & Kroumon, A. D., 2020). Η βιολαξανθίνη που απομονώθηκε από το *D. tertiolecta* έδειξε αναστολή της ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς αδenoκαρκινώματος του μαστού (σειρά MCF-7) (Pasquet P. et al., 2011). Ένα άλλο παράδειγμα είναι η φουκοξανθίνη, ένα καρτενοειδές που υπάρχει στα μικροφύκη, η οποία παρουσίασε ισχυρή αντικαρκινική ιδιότητα μέσω της πρόληψης της ανάπτυξης των κακοήθων κυττάρων, της διέγερσης των γονιδίων καταστολής του καρκίνου και της διακοπής των κυτταρικών κύκλων, ενώ δεν επηρεάζει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Takahashi K. et al., 2015).

Οι πολυακόρεστες αλδεΐδες είναι μια άλλη σημαντική ομάδα αντικαρκινικών ουσιών που απομονώνονται από μικροφύκη. Πριν από δύο δεκαετίες απομονώθηκαν τρεις πολυακόρεστες αλδεΐδες από τα θαλάσσια διάτομα *Talassiosira rotula*, *S. costatum* και *P. delicatissima* (Miralto A. et

al., 1999). Οι ουσίες αυτές ήταν η 2-trans-4-cis-7-cis-δεκατριενάλη, η 2-trans-4-trans-7-cis-δεκατριενάλη και η 2-trans-4-trans-δεκαδιενάλη. Διαπιστώθηκε ότι αυτές οι ουσίες είχαν αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (Caco-2). Σε μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνθετικές πολυακόρεστες αλδεΐδες (PUAs), που ανακαλύφθηκαν αρχικά σε διάτομα συμπεριλαμβανομένου του *S. marinoi*, οι οποίες ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα (A549) και αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (COLO 205), αλλά δεν μείωσαν σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων (κύτταρα BEAS-2B) (Sansone C. et al., 2014).

Η θεραπεία του καρκίνου μέσω της διαμόρφωσης της ανοσολογικής απόκρισης με τη χρήση πεπτιδίων έχει οδηγήσει σε πρωτοφανείς ανταποκρίσεις στους ασθενείς. Οι δυνατότητες των μικροφυκών ως πηγή νέων πεπτιδίων θεωρείται πιθανή χρήση στη διαχείριση του καρκίνου. Μεταξύ των περιορισμένων μελετών σχετικά με τις αντικαρκινικές επιδράσεις των πεπτιδίων, βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα σε συνολικά έξι διαφορετικές μορφές καρκίνου. Η πλειονότητα των μελετών έχει πραγματοποιηθεί με διαφορετικά στελέχη *Chlorella*, αλλά έχουν επίσης βρεθεί αποτελέσματα με τη χρήση πεπτιδίων από άλλα είδη. Αυτό ισχύει και για πεπτίδια με ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις και πεπτίδια με άλλες επιδράσεις που προάγουν την υγεία (π.χ. ρόλος στις καρδιαγγειακές παθήσεις). Ο μικρός αριθμός ειδών που έχουν διερευνηθεί, σε αντίθεση με τον μεγάλο αριθμό των διαθέσιμων ειδών, αποτελεί σαφή ένδειξη ότι οι δυνατότητες για νέες ανακαλύψεις είναι μεγάλες. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα και η οικονομική αποδοτικότητα των μικροφυκών τα καθιστούν ελκυστικά στην αναζήτηση βιοδραστικών πεπτιδίων για την πρόληψη του καρκίνου. Τα θεραπευτικά πεπτίδια έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των πρωτεϊνών ή των αντισωμάτων. Είναι εύκολο να συντεθούν, έχουν υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα στόχου, υψηλή δραστικότητα, χαμηλή συσσώρευση στους ιστούς και χαμηλή τοξικότητα. Από την άλλη πλευρά, τα θεραπευτικά πεπτίδια έχουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη σταθερότητά τους (μικρός χρόνος ημιζωής) και το υψηλό κόστος παραγωγής (Skjånes K. et al., 2021; Craik D. J. et al., 2013). Τα θεραπευτικά πεπτίδια που στοχεύουν στη θεραπεία του καρκίνου μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες:

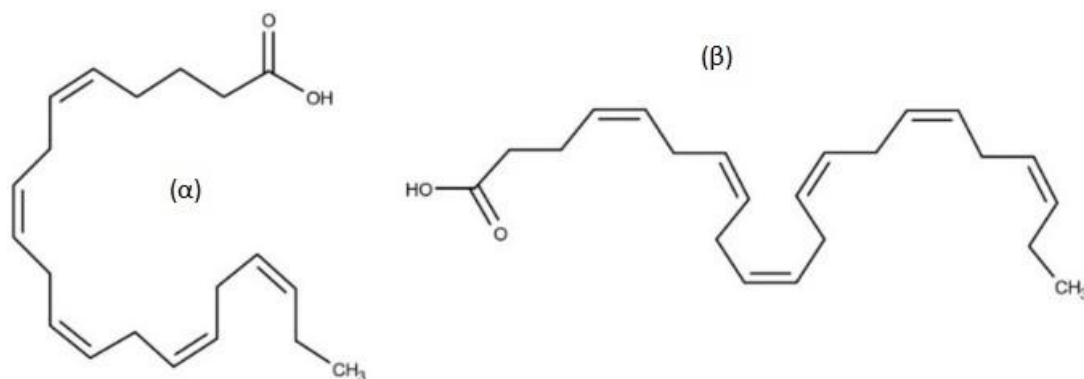
- αντιμικροβιακά πεπτίδια που αποτελούν μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού αμυντικού συστήματος και απαντούν φυσικά σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς,
- πεπτίδια με κυτταρική διαπερατότητα που παρέχουν έναν πολλά υποσχόμενο μηχανισμό για τη χορήγηση φαρμάκων και
- πεπτίδια στόχευσης σε όγκους που στοχεύουν σε δείκτες όπως υποδοχείς που εκφράζονται στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων (R. J. et al., 2012).

#### 4.4 Επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι διάφορες ενώσεις από μικροφύκη διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε μοντέλα ανθρώπων και ποντικών και αποτελούν πολλά υποσχόμενα φάρμακα με πιθανές εφαρμογές για τη θεραπεία ανθρώπινων παθολογιών (Riccio G. & Lauritano C., 2019), ωστόσο οι ενώσεις που ευθύνονται για τη δράση αυτή είναι συχνά ακόμη άγνωστες.

Τα μικροφύκη είναι γνωστό ότι είναι εξαιρετικοί παραγωγοί πολυσακχαριτών (polysaccharides, PS), συμπεριλαμβανομένων των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (exocellular polysaccharides, EPS) και των θειωμένων πολυσακχαριτών (sulphated polysaccharides, sPS). Οι PS έχουν αποδειχθεί ότι είναι καλές ανοσοτροποποιητικές ενώσεις (Riccio G. & Lauritano C., 2019). Οι sPS από θαλάσσιες πηγές παρουσίασαν ανοσοτροποποιητική δράση (Muhamad, I.I. et al., 2019) και είναι υποσχόμενοι υποψήφιοι για την ανάπτυξη φαρμάκων. Οι sSP έχουν βρεθεί σε διάφορα μικροφύκη και μικροφύκη, τόσο σε θαλάσσιο όσο και σε γλυκό νερό, όπως στο πράσινο φύκος *Monostroma nitidum*, στα ερυθρά φύκη *Gelidium corneum* και *Gracilaria caudata*, στο διάτομο *P. tricorutum*, στο δινομαστιγωτό *G. imrudicum*, στο ξανθοφύκος του γλυκού νερού *Tribonema sp.* και σε άλλα (Riccio G. & Lauritano C., 2019). Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης που αξιολογήθηκαν για τα sPS που εξάγονται από μικροφύκη, λίγες μελέτες έχουν αναφέρει λεπτομέρειες (Riccio G. & Lauritano C., 2019).

Επιπλέον, τα μικροφύκη αποτελούν σημαντική πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και είναι σε θέση να συνθέτουν τόσο ωμέγα-6 όσο και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και αρκετά είδη μικροφυκών έχουν χαρακτηριστεί για την παραγωγή PUFA. Στην κατηγορία των ωμέγα-6 λιπαρών οξέων περιλαμβάνονται το γ-λινολεϊκό οξύ (γ-linoleic acid, GLA) και το αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid, ARA), στην κατηγορία των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων περιλαμβάνονται το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid, EPA), γνωστό ως το πιο άφθονο PUFA στο φυτοπλαγκτόν, και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (docosahexaenoic acid, DHA) (Εικόνα 4.4.1.) (Jacob-Lopes E. et al., 2019). Τα διάτομα είναι τα κύρια φύκη που παράγουν ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, ιδίως EPA και DHA (Cui Y. et al., 2019). Διάφοροι συγγραφείς τόνισαν τις ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες των PUFA, καθώς και τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους (Zapata-Gonzalez F. et al., 2008).



**Εικόνα 4.4.1.:** Μοριακές δομές (α) του εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA) και (β) του δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (DHA).

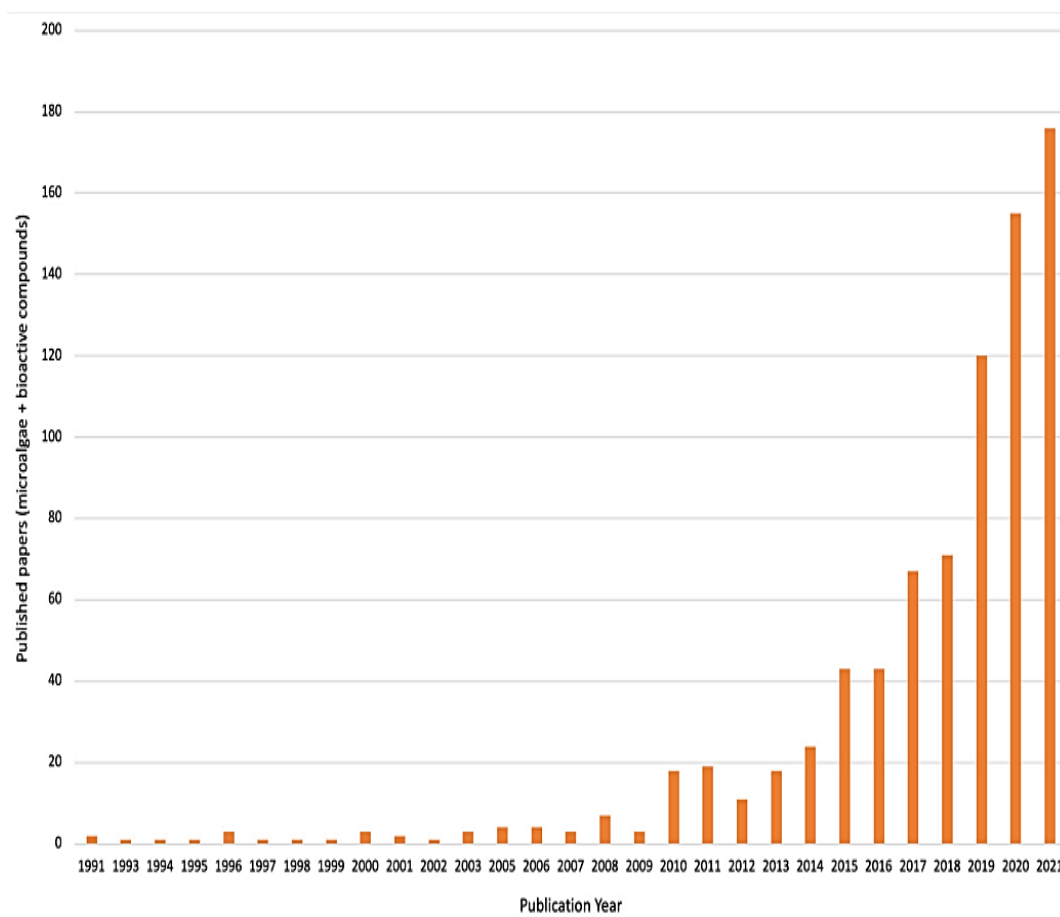
Μια άλλη σημαντική ένωση που προέρχεται από μικροφύκη είναι η ασταξανθίνη (astaxanthin, ASX). Η ASX είναι γνωστό ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, καρδιαγγειακή και αντιπολλαπλασιαστική δράση καθώς και δράση κατά της παχυσαρκίας (Riccio G. & Lauritano C., 2019). Το ASX έχει επίσης βρεθεί ότι ενισχύει την ανοσολογική απόκριση σε αρκετές μελέτες. Έχει εξετασθεί η επίδραση της ASX σε μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή, ελεγχόμενη μελέτη (Lin K.H et al., 2015). Η ASX χορηγήθηκε για 8 εβδομάδες σε δόση 2 ή 8 mg/ημέρα. Η ASX αύξησε την κυτταροτοξική δραστηριότητα των κυττάρων φυσικών φονέων και αύξησε τους συνολικούς υποπληθυσμούς των T και B κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι η ASX αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων σε μοντέλο ποντικών *in vitro* και αυξάνει τα επίπεδα IL-2 και INF-γ σε μοντέλο ποντικών *ex vivo* (Lin K.H et al., 2015).

## Κεφάλαιο 5: Βιομηχανικές εφαρμογές και δυνατότητες εμπορευματοποίησης μικροφυκών

### 5.1 Τα μικροφύκη στη βιομηχανία τροφίμων

Λόγω της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, η αυξημένη ζήτηση για τροφή αποτελεί μία από τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο πλανήτης. Σύμφωνα με προβλέψεις ο παγκόσμιος πληθυσμός αναμένεται να αυξηθεί κατά 2 δισεκατομμύρια έως το 2050, με συνέπεια η τρέχουσα διαθεσιμότητα νερού και γεωργικών εκτάσεων να μην επαρκεί για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος εφαρμόζονται διάφορες πρωτοβουλίες που στοχεύουν στην προώθηση υγιεινότερων διατροφικών συνηθειών οι οποίες ανταποκρίνονται στις διατροφικές απαιτήσεις και περιορίζουν την κατανάλωση επιβλαβών λιπών, αλάτων και σακχάρων (FAO, 2019). Η τεχνολογική εξέλιξη και τα προϊόντα τροφίμων συμβάλουν σε πιο εύκολα διαθέσιμες αλλά και προσιτές οικονομικά διατροφικές συνήθειες που οδηγούν σε πιο υγιεινές δίαιτες. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το γεγονός ότι υπάρχουν νέες διατροφικές τάσεις, όπως η χορτοφαγική και η vegan διατροφή, καθώς επίσης η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών για τις επιπτώσεις της κατανάλωσης τροφίμων, κυρίως ζωικής προέλευσης, στην ανθρώπινη υγεία αυξάνουν τη ζήτηση για τον σχεδιασμό λειτουργικών τροφίμων (Caroorgno M. P. & Mathys A., 2018).

Σε αυτό το πλαίσιο, τα μικροφύκη παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά χερσαία φυτά. Αρχικά, τα μικροφύκη μπορούν να φωτοσυνθέτουν πολύ πιο αποτελεσματικά από τα χερσαία φυτά και με αυτό τον τρόπο να είναι αποτελεσματικοί στην παραγωγή τροφής μέσω της φωτοσύνθεσης, ενώ διαθέτουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και σύντομη περίοδο συγκομιδής (8-10 ημέρες) σε σύγκριση με άλλες φυτικές πηγές. Η παραπάνω ιδιότητα επιτρέπει στα μικροφύκη να παράγουν ποσότητες μεγάλης πυκνότητας βιομάζας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, τα μικροφύκη μπορούν να αναπτύσσονται σε μη γεωργικές εκτάσεις, όπως παραθαλάσσιες περιοχές ή έρημα και ημίξηρα εδάφη, χρησιμοποιώντας αλμυρό νερό ή ακόμη και οριακά υγρά απόβλητα. Αυτή η ικανότητα επιτρέπει την ανάπτυξή τους σε περιοχές που η γεωργία μπορεί να είναι δυσκολότερη ή αδύνατη. Επιπρόσθετα, το κύριο πλεονέκτημα είναι η ικανότητά τους να συνθέτουν πολύτιμα προϊόντα τα οποία συγκαταλέγονται στα βιοδραστικά συστατικά, όπως καροτενοειδή, μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα, σάκχαρα, απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα, ένζυμα, βιταμίνες και μέταλλα χρήσιμα για την ανθρώπινη διατροφή. Την τελευταία δεκαετία παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση των δημοσιευμένων άρθρων που σχετίζονται με τα βιοδραστικά συστατικά των μικροφυκών (Εικόνα 5.1.1.) (Armenta RE & Valentine MC, 2013).

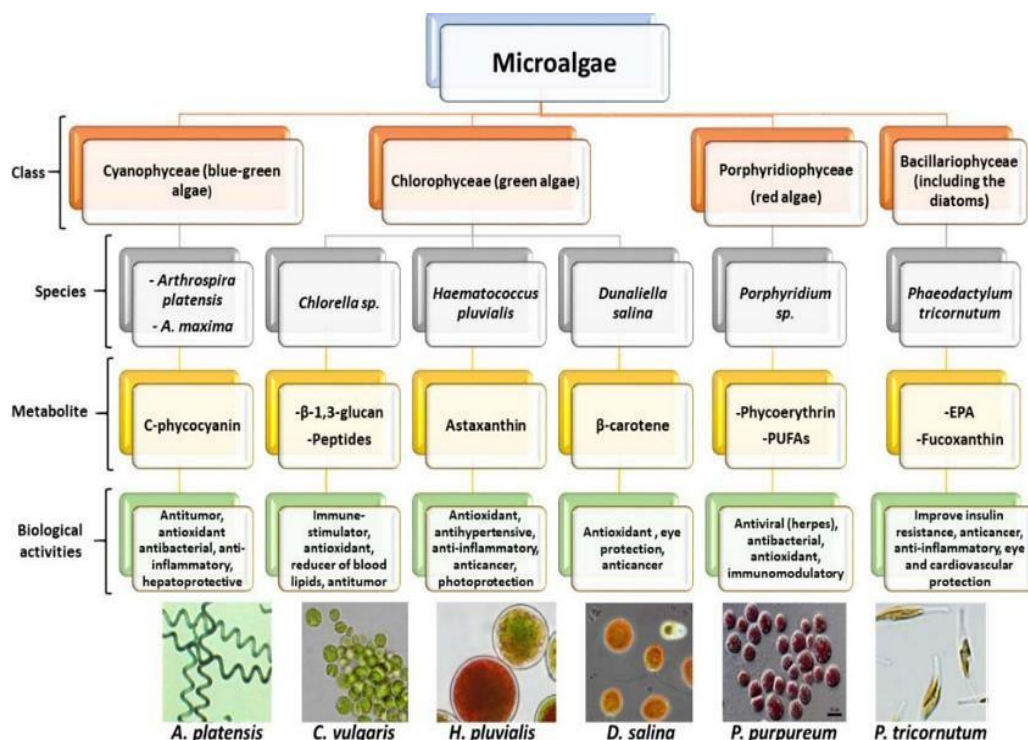


**Εικόνα 5.1.1:** Αριθμός δημοσιευμένων άρθρων με θέμα «Μικροάλγη και βιοδραστικά συστατικά» από τον Ιανουάριο 1991 ως το Δεκέμβριο του 2021 (Amrofo, J., 2022).

Διαφορετικοί συνδυασμοί μικροφυκών διατίθενται στις παγκόσμιες αγορές, με τους περισσότερους συνδυασμούς να πωλούνται ως συμπληρώματα διατροφής, σε μορφή σκόνης, ως κάψουλες, ως δισκία, ως παστίλιες και ως υγρά εναιωρήματα (Lafarga T., 2019).

Σήμερα, οι εμπορικές εγκαταστάσεις για την παραγωγή μικροφυκών είναι διάσπαρτες σε όλο τον κόσμο. Η Ταϊβάν, η Ιαπωνία, οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Κίνα, η Βραζιλία, η Ισπανία, το Ισραήλ, η Γερμανία και η Μιανμάρ είναι οι κύριοι παραγωγοί βιομάζας μικροφυκών και των προϊόντων που προέρχονται από αυτά. Η ετήσια παραγωγή βιομάζας μικροφυκών σε ξηρή μορφή ισοδυναμεί με ~19.000 τόνους, με εκτιμώμενη παραγωγή 5,7 δισεκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ (Martinez Angulo, L. D., & Ramirez Merida L. G., 2017). Τα περισσότερα προϊόντα με βάση τα μικροφύκη διατίθενται στο εμπόριο στην Ασία, στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Η τελευταία κυριαρχεί όχι μόνο στην παραγωγή προϊόντων διατροφής με βάση τα μικροφύκη, αλλά και στην παγκόσμια αγορά αυτών των προϊόντων (Credence Research, 2018). Πριν από το 1997, μόνο έξι μικροφύκη είχαν εγκριθεί για ανθρώπινη κατανάλωση. Ο κατάλογος αυτός αποτελούνταν από τα *Aphanizomenon flosaquae*, *Arthrospira platensis*, και *Spirulina sp.*, όλα τα κυανοβακτήρια, και *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella*

*pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, που ανήκουν στα πράσινα φύκη. Σήμερα, στην ΕΕ τα εμπορικά καλλιεργούμενα μικροφύκη περιλαμβάνουν, έλαιο από *Ulkenia sp.*, έλαιο πλούσιο σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA) από το *Schizochytrium sp.*, ασταξανθίνη από το *Haematococcus pluvialis*, και ολόκληρο το φύκος που αφορά την *Odontella aurita* και *Tetraselmis chui*, από τις οποίες ο μόνος περιορισμός είναι η ανάπτυξή τους πραγματοποιείται αποκλειστικά σε αντιδραστήρες. Στην αγορά κυριαρχούν σήμερα (Εικόνα 5.1.2.) η *Arthrospira* και η *Chlorella*, οι οποίες πωλούνται σε περισσότερες από 20 χώρες παγκοσμίως. Η *Arthrospira* προωθείται για την περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, GLA και φυκοκυανίνες. Η *Chlorella*, εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, παρέχει τον αυξητικό παράγοντα *Chlorella*, ο οποίος είναι ένα υδατοδιαλυτό εκχύλισμα που αποτελείται από διάφορες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων βασικών αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, βιταμινών, σακχάρων και νουκλεϊκών οξέων (Merchant R.E. & Andre C.A., 2001). Άλλα μικροφύκη, όπως το *Tetraselmis chui*, διατίθενται στο εμπόριο ως αρωματικοί παράγοντες θαλασσιών και το *Odontella aurita* ως συμπλήρωμα διατροφής. Ορισμένα προϊόντα που προέρχονται από μικροφύκη και διατίθενται στο εμπόριο είναι το β-καροτένιο από *Dunaliella*, DHA από *Cryptocodinium cohnii* και η μπλε χρωστική ουσία φυκοκυανίνη από *Arthrospira* (Garcia J. L., de Vicente M. & Galan B., 2017).



**Εικόνα 5.1.2.:** Κύριες τάξεις των μικροφυκών με τα πιο σημαντικά τους είδη τα οποία σχετίζονται χρήσιμες βιολογικές δράσεις (<https://www.enhancemicroalgae.eu/wp-content/uploads/2020/05/EMA-Strain-catalogue-2nd-Edition.pdf>).



Ορισμένα από αυτά τα προϊόντα που προέρχονται από μικροφύκη, ιδίως το β-καροτένιο, η ασταξανθίνη και η φυκοκυανίνη, έχουν υψηλό κόστος στην αγορά και μπορεί να κοστίζουν εκατοντάδες ή και χιλιάδες ευρώ ανά κιλό ανάλογα με την καθαρότητά τους (Carorgno M.P. & Mathys A., 2018). Από την άλλη πλευρά, το κόστος της αγοράς συμπληρωμάτων διατροφής από μικροφύκη είναι περίπου 40 ευρώ ανά kg (Enzing C., 2014). Συνεπώς, τα μικροφύκη που βασίζονται σε προϊόντα με βιοδραστικές ενώσεις θα μπορούσαν να βελτιώσουν την οικονομική σκοπιμότητα της όλης μεταποίησης, καθώς οι υψηλότερες τιμές πώλησης θα μπορούσαν να καλύψουν το υψηλότερο κόστος που σχετίζεται με την καλλιέργεια μικροφυκών και τις μεταγενέστερες διαδικασίες (Carorgno M.P. & Mathys A., 2018). Παρά την αρχική απροθυμία για τα νέα τρόφιμα, ο εμπλουτισμός των τροφίμων με θρεπτικές ουσίες και τα συμπληρώματα διατροφής έχουν γίνει ολοένα και πιο δημοφιλείς μέθοδοι για την παροχή θρεπτικών και λειτουργικών προϊόντων διατροφής. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει στη βιομηχανία μικροφυκών να διαφοροποιηθεί και να αναπτυχθεί εκτός του πεδίου των συμπληρωμάτων υγιεινής διατροφής, μια αγορά που επί του παρόντος χρησιμοποιεί το 75% της βιομάζας για την παραγωγή σκονών, δισκίων και καψουλών.

#### 5.1.1 Διατροφοδραστικά συστατικά (Nutraceuticals)

Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες θεωρούνται κατάλληλη πηγή πρωτεΐνης για την ανθρώπινη διατροφή καθώς απορροφώνται αποτελεσματικότερα στη γαστρεντερική οδό συγκριτικά με τις άθικτες πρωτεΐνες ή τα ελεύθερα αμινοξέα (Lisboa C. R. et al., 2014). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες μικροφυκών θα μπορούσαν να παρουσιάσουν ευεργετικές ιδιότητες που σχετίζονται με την επιφάνεια των πρωτεϊνών και θερμοδυναμικές ιδιότητες, καθιστώντας τις υποσχόμενες ως παράγοντες αφρισμού και γαλακτωματοποίησης, καθώς και ως πηκτικά μέσα στη βιομηχανία τροφίμων. Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων κυρίως ως πηκτικά και παράγοντες πήξης και σταθεροποίησης. Πολλά είδη μικροφυκών μπορούν να παράγουν πολυσακχαρίτες, όπως άμυλο, γλυκογόνο, χρυσολαμιναρίνη, και παραμυλόνη. Αυτά έχουν διάφορες εφαρμογές όπως: αντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές. Οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών διαθέτουν επίσης πρεβιοτικές ιδιότητες (de Jesus Raposo M. F. et al., 2016).

Τα μικροφύκη αποτελούν επίσης μια εναλλακτική πολύτιμη πηγή ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), καθώς συνθέτουν μέλη της οικογένειας των ωμέγα-6 λιπαρών οξέων (ω-6) στα οποία περιλαμβάνεται το λινολεϊκό οξύ, το γ-λινολενικό οξύ (GLA), το αραχιδονικό οξύ (ARA), καθώς και αυτά της οικογένειας των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων (ω-3) που περιλαμβάνουν το λινολενικό οξύ, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.1.3. και ιδιαίτερα τα θαλάσσια στελέχη από τα γένη *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Pavlova*, *Phaedactylum*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* και *Tetraselmis* (de Jesus Raposo

M. F. et al., 2016) και κατά συνέπεια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως συμπληρώματα διατροφής. Σε σύγκριση με την αλίευση, τα φύκη αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα και δεν συμβάλλουν στην υπεραλίευση καθιστώντας τα μια πιο βιώσιμη εναλλακτική πηγή παραγωγής ελαίων έναντι του ιχθυελαίου (Adarme-Vega et al., 2014). Επιπλέον, καθώς τα μικροφύκη καλλιεργούνται υπό ελεγχόμενες συνθήκες και καθαρίζονται, το έλαιο από φύκη είναι απαλλαγμένο από τοξίνες και βαρέα μέταλλα, όπως ο υδράργυρος και ο μόλυβδος, που μπορεί να υπάρχουν στα ιχθυηρά και τα ιχθυέλαια (Harwood G. L., 2019).

Fatty acid fraction	Microalgae source	Application of the fatty acid	Daily intake recommendation for human (mg)
<b>Omega-3</b>			
Alpha-linolenic acid (ALA)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Nutritional supplement (single cell oil)	1000–2000
Eicosapentaenoic acid (EPA)	<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Phaeodactylum tricoratum</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>Isochrysis galbana</i>	Nutritional supplement, Psychotherapeutic medication, brain development for children, cardiovascular health	250–500
Docosahexaenoic acid (DHA)	<i>Schizochytrium limacinum</i> , <i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Pavlova lutheri</i>	Food supplement, important for brain and eye development at fetus and for children, significant for cardiovascular health, adult dietary supplement in food	250–500
<b>Omega-6</b>			
Gamma-linolenic acid (GLA)	<i>Arthrospira platensis</i>	Nutritional supplements, anti-inflammatory, auto-immune diseases	500–750
Arachidonic acid (ARA)	<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Mortierella alpina</i> , <i>Parietochloris incisa</i>	Nutritional supplements, anti-inflammatory, muscle anabolic formulations (body buider)	50–250

**Εικόνα 5.1.3.:** Λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας τα οποία είναι χρήσιμα στην τεχνολογία τροφίμων με προέλευση τα μικροφύκη (Angelo Paggi Matos, 2017)

Επιπλέον, τα έλαια μικροφυκών περιέχουν στερόλες και καροτενοειδή, προσδίδοντάς τους μια πρόσθετη διατροφική προστιθέμενη αξία σε σύγκριση με το ιχθυέλαιο (Ryckebosch E. et al., 2014). Το 2004, ο Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) υποστήριξε ότι τα τρόφιμα που περιέχουν ω-3 PUFAs, ιδίως EPA και DHA, μειώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας καρδιακής νόσου (Adarme-Vega T. C. et.al, 2014). Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση των τριγλυκεριδίων και στην αύξηση της HDL και συσχετίζονται με την πρόληψη ή τη βελτίωση των οφθαλμικών, νευρολογικών και νεφρικών παθήσεων, της αρθρίτιδας και της υπέρτασης (de Jesus Raposo et.al, 2016).

Οι χρωστικές ουσίες των μικροφυκών (Εικόνα 5.1.4.) ανήκουν, γενικά, σε μία από τρεις κατηγορίες: i) χλωροφύλλες, ii) καροτένια και ξανθοφύλλες και iii) φυκοπρωτεΐνες, όπως η γ-φυκοκυανίνη και η αλλοφυκοκυανίνη. Επί του παρόντος, τα καροτενοειδή (β-καροτένιο, λυκοπένιο και ασταξανθίνη) χρησιμοποιούνται κυρίως ως διαιτητικά συμπληρώματα, για τον εμπλουτισμό τροφίμων και ως

φυσικές χρωστικές ουσίες τροφίμων και ποτών. Παρέχουν οφέλη για την υγεία, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασικά, αντικαρκινικά, αντιοξειδωτικά, αντικαταθλιπτικά, και αντιγηραντικά χαρακτηριστικά (Soares A. T. Et al., 2016). Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει αυτές τις χρωστικές ουσίες, οπότε βασίζεται αποκλειστικά στη διατροφική τους πρόσληψη. Το καροτένιο στο *Arthrospira* και η ασταξανθίνη στο *Haematococcus pluvialis* μπορεί να ευθύνονται για περισσότερο από το 80% (σε σχέση με τη βιομάζα) των συνολικών καροτενοειδών στα κύτταρα. Τα θαλασσινά (όπως ο σολωμός, οι γαρίδες, τα καβούρια, οι αστακοί, οι καραβίδες και η πέστροφα) είναι η κύρια πηγή ασταξανθίνης στην ανθρώπινη διατροφή, αλλά η ποσότητά τους είναι συνήθως ανεπαρκής. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ενέκρινε την ασταξανθίνη ως συμπλήρωμα διατροφής το 1999, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων της που απορρέουν από τα ισχυρά αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά της (Fassett R.G.; Coombes, J.S., 2011). Επιπλέον, διαθέτει αντιδιαβητική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιυπερτασική, αντιγηραντική επίδραση ενώ έχουν αναφερθεί θετικές επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα μάτια και τον εγκέφαλο (Mohammadi-Gouraji E., 2019). Η φυκοκυανίνη είναι μια άλλη χρωστική ουσία μπλε χρώματος και είναι άμεσα διαθέσιμη για την εισαγωγή της στην επεξεργασία τροφίμων και οικονομικά ελκυστική (Chew K.W. et.al, 2017).

Pigment	Color of pigment	Microalgal representative	Application of the pigment
Chlorophylls	Green	All phototrophic oxygenic algae	Pharmaceutical and cosmetics (deodorant)
Carotenoids (Carotenes)			
β-Carotene	Yellow	<i>Dunaliella salina</i> , <i>D. bardawil</i>	Pro-vitamin A, antioxidant food, additive E160a, coloration of egg yolk
Bixin	Yellowish to peach-color	<i>Dunaliella salina</i>	Food additive E160b (colorant), cosmetics
Carotenoids (Xanthophylls)			
Astaxanthin	Reddish-salmon	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Botryococcus braunii</i>	Food additive E161j, antioxidant, farming of salmon and trout (color, immune-response)
Canthaxanthin	Golden-orange	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i>	Food additive E161 g, farming of salmonids and chicken, tanning pills
Fucoxanthin	Brown to olive	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Anti-adipositas
Lutein	Yellow-orange	<i>Chlorella salina</i> , <i>C. zofingiensis</i> , <i>D. salina</i>	Food additive E161b, yellow coloration of egg yolk (feed additive), pigmentation of animal tissues, pharmaceutical (anti-macular degeneration), cosmetics (coloration)
Violaxanthin	Orange	<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Dunaliella tetralecta</i>	Food additive E161e (approved in Australia & New Zealand)
Zeaxanthin	Orange-yellow	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Food additive E161 h, animal feed, pharmaceutical (anti-colon cancer, eye health)
Phycobilins			
Phycocyanin	Blue-green (“cyano”)	<i>Arthrospira</i> , <i>Spirulina</i> (cyanobacteria)	Food colorant (beverages, ice cream, sweets), cosmetics, fluorescent marker in histochemistry, antibody labels, receptors and other biological molecules
Phycocerythrin	Red	<i>Porphyridium</i> , cyanobacteria	Immunofluorescence techniques, labels for antibodies
Tocopherol (α-Tocopherol)	Brown	<i>Chlorella sp.</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Euglena gracilis</i>	Vitamin E, food additive E306, E307, E308 antioxidant in cosmetics and foods

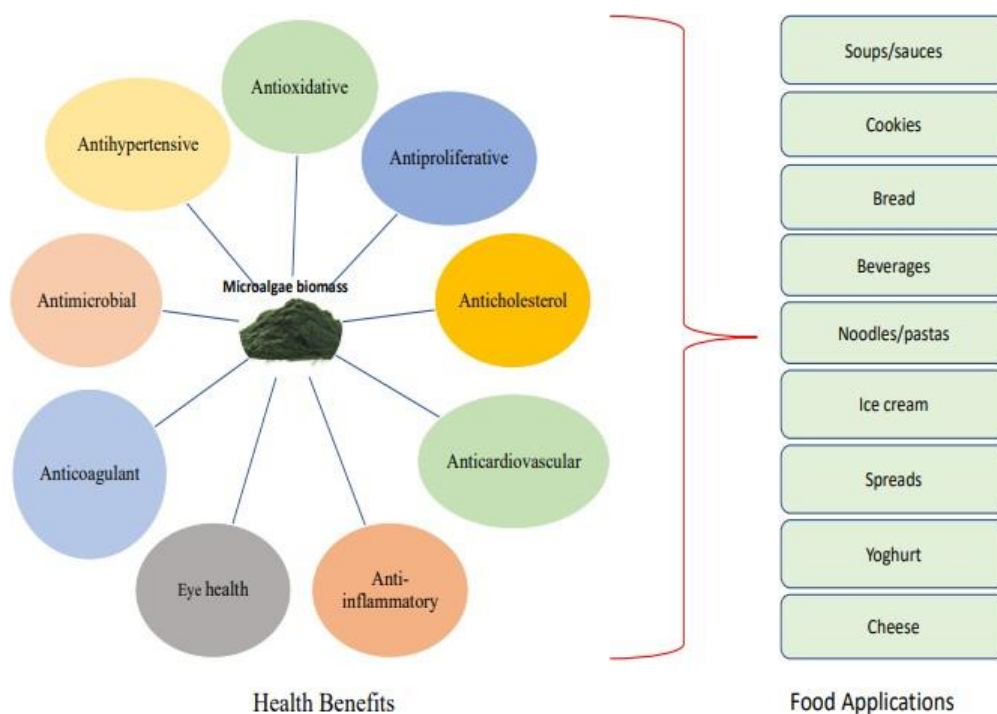
**Εικόνα 5.1.4:** Χρωστικές μικροφυκών και τα δυναμικά πεδία εφαρμογής τους (Angelo Paggi Matos, 2017)

Τα μικροφύκη περιέχουν επιπλέον υδατοδιαλυτές βιταμίνες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά ή συμπληρώματα διατροφής και να συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς έχουν αντιοξειδωτική δράση, επάγουν τον κυτταρικό σχηματισμό και βοηθούν στην πήξη του αίματος (Chew et.al, 2017). Αποτελούν πηγή σχεδόν όλων των βασικών βιταμινών, συμπεριλαμβανομένων των τοκοφερόλων, του ασκορβικού οξέος, των βιταμινών B1, B2, B3, B6, B9, B12, παντοθενικό οξύ, νικοτινικό οξύ, ινοσιτόλη και βιοτίνη (Da S Vaz et.al, 2016). Η βιταμίνη B12, που συνήθως βρίσκεται μόνο σε ζώα και ο σίδηρος, ειδικότερα, μπορεί να βρεθεί σε υψηλά επίπεδα σε ορισμένα μικροφύκη, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέροντα ως συμπληρώματα διατροφής για χορτοφάγους (Gouveia L. et al., 2008).

### 5.1.2 Λειτουργικά τρόφιμα (Functional foods)

Τα λειτουργικά τρόφιμα προκαλούν ευεργετικές φυσιολογικές επιδράσεις, βελτιώνοντας την ευεξία και την υγεία και μειώνοντας τον κίνδυνο ασθενειών (Gouveia L. et al., 2008). Ο κατάλογος των οφελών για την υγεία που προκύπτουν από την κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων που περιέχουν

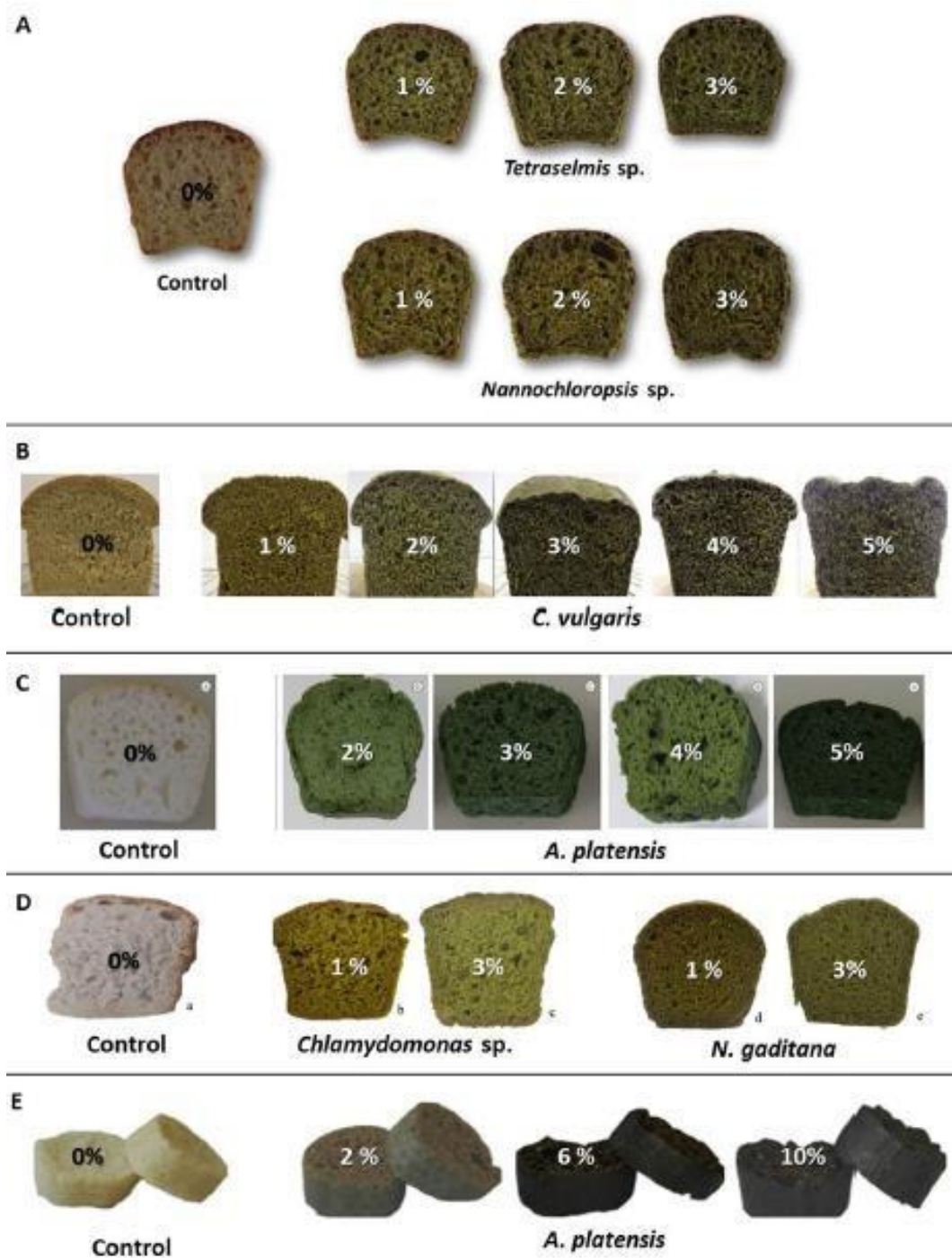
συστατικά από άγλη αυξάνεται σταθερά όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1.5. Τα λειτουργικά τρόφιμα που συμπληρώνονται με βιομάζα μικροφυκών αυξάνουν τη θέση τους στην αγορά τροφίμων λόγω των αισθητηριακών πλεονεκτημάτων, της ευκολίας και της ποικιλομορφίας τους, συνδυάζοντας την ελκυστικότητα με τα οφέλη για την υγεία (Chaco'n-Lee T. L. & Gonz'alez-Marin'ο G. E., 2010). Κατά την τελευταία δεκαετία, αρκετές εταιρείες έχουν αρχίσει να εμπλέκονται στην ανάπτυξη τροφίμων που περιέχουν μικροφύκη ή κυανοβακτήρια (Lafarga T., 2019). Τα περισσότερα τρόφιμα που περιέχουν μικροφύκη και τα οποία διατίθενται σήμερα στο εμπόριο περιέχουν είτε τη σπιρουλίνα είτε τη χλωρέλλα. Η ενσωμάτωση βιομάζας μικροφυκών σε παραδοσιακά προϊόντα διατροφής πραγματοποιείται ήδη σε εμπορική κλίμακα, με ορισμένα προϊόντα να κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγορά.



**Εικόνα 5.1.5.:** Σχηματική αναπαράσταση των ευεργετικών ιδιοτήτων αλλά και τα τρόφιμα στα οποία εφαρμόζονται οι ενώσεις που παράγονται από τα μικροφύκη (Ampofo ,2022)

Το ψωμί είναι το προϊόν αρτοποιίας με την μεγαλύτερη κατανάλωση και αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικό τρόπο για την παροχή βιοδραστικών ενώσεων μικροφυκών με πολύτιμα για την υγεία οφέλη. Η ενσωμάτωση μικροφυκών για την ενίσχυση της θρεπτικής αξίας και της υφής του πραγματοποιήθηκε πριν από 20 και πλέον χρόνια (Arafah A. et al., 1981). Σε αρκετές μελέτες το κυανοβακτήριο *Arthrospira* καθώς και τα εκχυλίσματά του ενσωματώθηκαν σε ψωμί αυξάνοντας τα επίπεδα πρωτεΐνης και ανόργανων συστατικών. Άλλα είδη μικροφυκών, όπως τα *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus almeriensis*, *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* έχουν επίσης

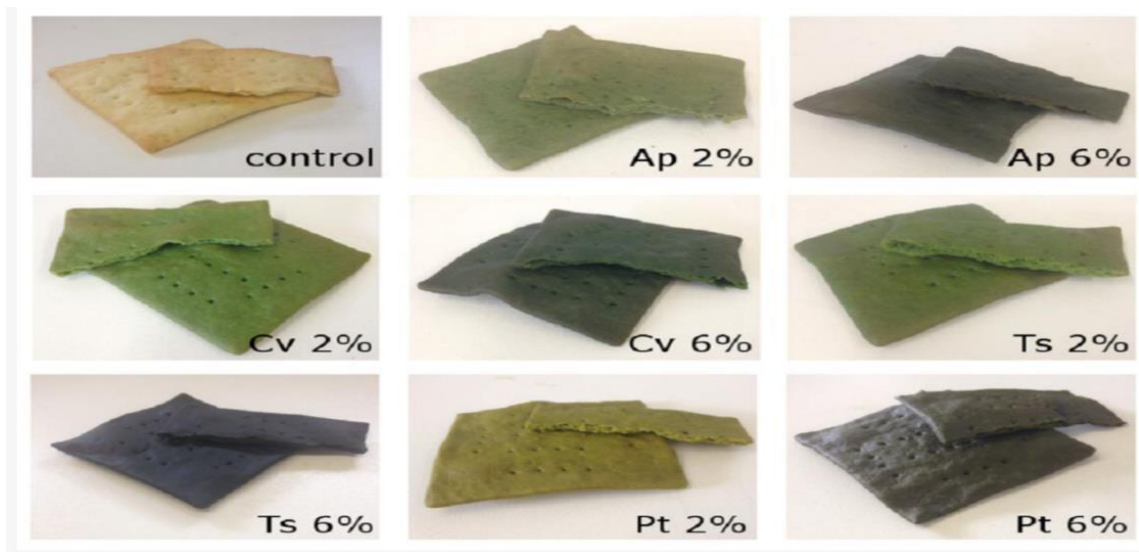
ενσωματωθεί στο ψωμί όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5.1.6., επηρεάζοντας το χρώμα, την κρούστα και την ψίχα του που συνεπάγονται την αύξηση του μαυρίσματος (Garcia-Segovia P. et al., 2017). Τα μικροφύκη έχουν επίσης εφαρμοστεί στο ψωμί χωρίς γλουτένη, όχι μόνο για να ενισχύσουν τη διατροφική του αξία, αλλά και για να μιμηθούν το δίκτυο της γλουτένης, βελτιώνοντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ζύμης και του ψωμιού (Khemiri S. et al., 2020). Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το *Arthrospira platensis* για την ενσωμάτωσή του σε διάφορα αρτοσκευάσματα, όπως τα "κροστίνι" από προζύμι στρόντελ, κρουασάν, κέικ μανιόκας και ντόνατς.



**Εικόνα 5.1.6.:** Ψωμί συμπληρωμένο με διαφορετικά μικροφύκη: (Α) *Tetraselmis sp.* και *Nannochloropsis sp.* (1%3% κ.β./κ.β.) (Β) *Chlorella vulgaris* (0%5% κ.β./κ.β.) (Γ) ψωμί χωρίς γλουτένη με *Arthrospira platensis* (2%5% κ.β./κ.β) (Δ) ψωμί χωρίς γλουτένη με *Chlamydomonas sp.* και *Nannochloropsis gaditana* (1% και 3% κ.β./κ.β) (Ε) "κροστίνι" από προζύμι με (2%, 6% και 10% (κ.β./κ.β.) *Arthrospira platensis* (Alice Ferreira et al., 2021)

Τα μπισκότα είναι άλλα προϊόντα αρτοποιίας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες για την ενσωμάτωση συστατικών με βάση τα μικροφύκη. Τα μικροφύκη μπορούν να ενσωματωθούν στα

μπισκότα για διαφορετικούς σκοπούς. Η χρήση των συσκευασμένων σνακ αυξάνεται παγκοσμίως λόγω της εύκολης και πρακτικής κατανάλωσής τους και της αυξανόμενης ποικιλίας τους. Ωστόσο, τα περισσότερα έχουν χαμηλή θρεπτική αξία με μειωμένες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Έτσι, η ζήτηση για σνακ με βελτιωμένες διατροφικές και λειτουργικές ιδιότητες παρουσιάζει μεγάλη αύξηση. Έχει γίνει ανάπτυξη ορισμένων τα οποία είναι εμπλουτισμένα με *Arthrospira sp.* και άλλα είδη με παραδείγματα στην Εικόνα 5.1.7. (Joshi S. M. R., Bera M. B. & Panesar P. S., 2014). Ένας άλλος τομέας στον οποίο έχει γίνει ενσωμάτωση βιομάζας μικροφυκών είναι αυτός των ζυμαρικών, που έγινε ενσωμάτωση των *Chlorella vulgaris* και *Spirulina maxima* για τη βελτίωση της διατροφικής τους αξίας παρουσιάζοντας καλύτερες ποιοτικές παραμέτρους, όπως σταθερότητα χρώματος (Fradique M. et al., 2010).



**Εικόνα 5.1.7.:** Το Ap αντιστοιχεί στο *A. Platensis*, το Cv στο *C. Vulgaris*, το Ts στο *T. Suecica* και το Pt στο *P. Tricornutum* τα οποία έχουν ενσωματωθεί ως βιομάζα σε αναλογία από 2-6% στα σνακ (Amrofo ,2022)

Αρκετοί επιστήμονες έχουν, επίσης, μελετήσει την ενσωμάτωση μικροφυκών σε γαλακτοκομικά προϊόντα ως φορείς βιοδραστικών ενώσεων. Διαπιστώθηκε ότι τα είδη *Arthrospira* θα μπορούσαν να ενισχύσουν την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων στο ζυμωμένο γάλα, στη γιαούρτη και στο επεξεργασμένο τυρί (Beheshtipour H. et al., 2013). Επιπλέον, τα προϊόντα αυτά όχι μόνο παρουσίασαν καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλά και διατροφικό περιεχόμενο (πρωτεΐνες, φυτικές ίνες και μέταλλα) και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Τα προϊόντα κρέατος είναι σημαντικές πηγές θρεπτικών συστατικών όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, ανόργανων συστατικών και βιταμινών, που τα καθιστούν μια ευρέως καταναλισκόμενη ομάδα τροφίμων σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, η αγορά καινοτομεί συνεχώς για να ανταποκρίνεται στις συνεχώς μεταβαλλόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών. Έχει παρατηρηθεί μια αξιοσημείωτη τάση



ανάπτυξης προϊόντων κρέατος που έχουν αντικατασταθεί εν μέρει με μια φυτική πηγή, ιδίως με πρωτεΐνες σόγιας. Ωστόσο, λόγω της πιθανής αλλεργιογένειας της σόγιας, έχει προκληθεί ενδιαφέρον για τη χρήση πρωτεϊνών από μικροφύκη στα τρόφιμα (Madeira M. S. et al., 2017). Νέες μελέτες ενσωματώνουν μικροφύκη στο κρέας όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1.8., σε μπιφτέκια και χοιρινά λουκάνικα, μπιφτέκια βοδινού κρέατος κ.λπ. (Marti-Quijal F. J. et al., 2018).



**Εικόνα 5.1.8.:** Προϊόντα κρέατος εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες από *Arthrospira sp.* και *Chlorella sp.* σε σύγκριση με το αρχικό δείγμα (πρωτεΐνη σόγιας): (A) φρέσκα λουκάνικα, (B) Κοτόπουλο Roti (Γ) μοσχάρια μπιφτέκια (Alice Ferreira et.al, 2021)

## 5.2 Εφαρμογές στην Υδατοκαλλιέργεια και τις Ζωοτροφές

### 5.2.1 Ζωοτροφές

Η θρεπτική αξία των μικροφυκών για την κτηνοτροφία είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Αρχικά, εξαρτάται από το είδος των μικροφυκών και τη χημική τους σύνθεση (π.χ. πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και ανόργανα άλατα), και δεύτερον, από την προσαρμογή του ζώου σε αυτή τη διατροφή. Πρόσφατα, έγινε η ανακάλυψη σχετικά με τη χρήση των λιπιδίων που εξάγονται από τα μικροφύκη ως συμπλήρωμα στα σιτηρέσια των ζώων. Επιτυχημένα πειράματα έχουν αποδείξει την υψηλή διατροφική αξία των μικροφυκών στη διατροφή χοίρων, αγελάδων και

προβάτων, κοτόπουλου και άλλων οικόσιτων ζώων και κατοικίδιων καθώς και στην υδατοκαλλιέργεια. Από διατροφική άποψη, τα μικροφύκη προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, από πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες έως βιταμίνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικά δικαιολογώντας έτσι τη χρησιμότητά τους ως συστατικά των ζωοτροφών. Επιπλέον, επηρεάζει θετικά την ασφάλεια των τροφίμων και την ποιότητα, βελτιώνοντας τη διατροφική ποιότητα των κρεάτων που καταναλώνονται (χοιρινό και κρέας πουλερικών), μέσω του εμπλουτισμού τους σε n-3 LCPUFA, κυρίως EPA και DHA, καροτενοειδή αντιοξειδωτικά και ιώδιο.

Η χρήση μικρής βιομάζας μικροφυκών στις ζωοτροφές μπορεί να ωφελήσει τη φυσιολογία των ζώων βελτιώνοντας την ανοσολογική απόκριση, την αντίσταση σε ασθένειες, την αντιική και αντιβακτηριακή δράση, τη λειτουργία του εντέρου και τη διέγερση του αποικισμού των προβιοτικών. Όλες αυτές οι πτυχές έχουν ως αποτέλεσμα τον έλεγχο του βάρους των ζώων, την προώθηση της ανάπτυξης, τη βελτίωση της μεταβολής της τροφής και της αναπαραγωγικής απόδοσης (Harel M. & Clayton D., 2007). Εκτός από τα κυανοβακτήρια *Arthrospira* και *Aphanizomenon*, τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροφυκών περιέχουν κυτταρινούχο υλικό που επηρεάζει διαφορετικά τα μηρυκαστικά και τα μονογαστρικά. Ενώ για τα μηρυκαστικά τα μικροφύκη μπορούν να παρέχονται άμεσα, για τα μονογαστρικά ζώα είναι απαραίτητη η επεξεργασία της βιομάζας πριν από την ενσωμάτωση στην τροφή (Becker E. W., 2007).

Μέχρι και το 30% της σημερινής παγκόσμιας παραγωγής φυκών πωλείται για χρήση που αφορά την εφαρμογή σε ζωοτροφές (Becker E. W., 2007) και περιλαμβάνει ως επικρατέστερα είδη τα *Schizochytrium sp.*, *Chlorella sp.*, *Arthrospira sp.*, *Isochrysis sp.* και *Porphyridium sp.* Η *Arthrospira* είναι υπεύθυνη αποκλειστικά για το 50% της παγκόσμιας παραγωγής με χρήση ως συμπλήρωμα των ζωοτροφών (Yamaguchi K., 1996), λόγω της εξαιρετικής του θρεπτικής σύνθεσης και της εύκολης πεπτικότητας που αποδίδεται στη μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στη σύνθεσή της (Yaakob Z. et al., 2014).

Η ποσότητα των μικροφυκών που περιλαμβάνονται στις ζωοτροφές ποικίλλει ανάλογα με το είδος των μικροφυκών και το είδος του ζώου. Για παράδειγμα, η διατροφή με *Arthrospira platensis* χρησιμοποιείται σε υψηλή συγκέντρωση στα μηρυκαστικά (<20%), στα πουλερικά (<21%) και στα κουνέλια (<15%) βελτιώνοντας την παραγωγικότητα των ζώων με μικρές επιπτώσεις στην ποιότητα του κρέατος. Όσον αφορά το *Schizochytrium sp.*, τα υψηλότερα ποσοστά της εφαρμόστηκαν στα πουλερικά (7,4%) σε σύγκριση με τους χοίρους, τα μηρυκαστικά και τα κουνέλια. Η πιο θετική επίπτωση της ενσωμάτωσης μικροφυκών ήταν η βελτίωση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο κρέας με αύξηση των επιπέδων των n-3 LCPUFA, δηλαδή των EPA και DHA. Οι αντίθετες επιδράσεις των μικροφυκών αναφέρθηκαν στην απόδοση της ανάπτυξης σε χοίρους και πουλερικά σε σχέση με

τα αρνιά. Η χλωρέλλα συμπεριλήφθηκε συστηματικά στις ζωοτροφές σε πολύ χαμηλά ποσοστά (<1,25%) και αυτό βρέθηκε ότι ωφελεί την απόδοση της ανάπτυξης στα πουλερικά. Από την άποψη αυτή, τα πουλερικά ξεχωρίζουν ως το ζώο-στόχος για τη χρήση των μικροφυκών ως συστατικό στη ζωοτροφή τους, κυρίως επειδή η διαιτητική ενσωμάτωση μικροφυκών για τα πουλερικά προσφέρει ένα ευνοϊκότερο πλαίσιο για την εμπορική τους χρήση (Becker E. W., 2007).

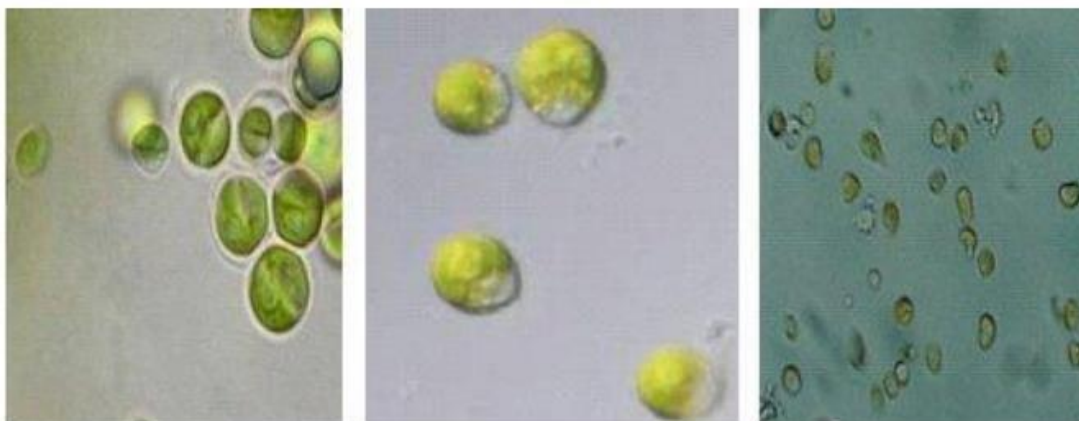
Η χρήση μικροφυκών ως συστατικά ζωοτροφών είναι πολλά υποσχόμενη ως εναλλακτική λύση έναντι της χρήσης του καλαμποκιού και της σόγιας, μετριάζοντας έτσι τη χρήση τους στη βιομηχανία των ζωοτροφών και συμβάλλοντας στη βιωσιμότητα της γεωργίας και την προστασία του περιβάλλοντος, στη βιώσιμη διαχείριση των φυσικών πόρων και στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας. Προσοχή χρειάζεται βέβαια στο γεγονός ότι τα μικροφύκη μπορούν εύκολα να συσσωρεύσουν βαρέα μέταλλα, όπως το αρσενικό και ο μόλυβδος, τα οποία είναι δυνητικά επιβλαβή για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου, απαιτώντας έτσι παρακολούθηση για την αποφυγή τοξικών επιδράσεων.

Τέλος, πρόσθετες προκλήσεις σχετίζονται με την οικονομικά αποδοτική χρήση των μικροφυκών από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Στην πραγματικότητα, είναι απαραίτητο να βελτιωθεί η τρέχουσα τεχνολογία για την καλλιέργεια μικροφυκών προκειμένου να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Επιπλέον, προβλέπεται ότι στο εγγύς μέλλον η αποτελεσματικότητα των μικροφυκών για μονογαστρικές δίαιτες θα μπορούσε να ρυθμιστεί με τα τεχνητά CAZymes, την επόμενη γενιά ενζύμων ζωοτροφών, λόγω της αποικοδόμησης των δύσπεπτων κυτταρικών τοιχωμάτων και της επακόλουθης αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών. Η τελική απαίτηση είναι να ικανοποιηθούν οι προσδοκίες των καταναλωτών κρέατος προσφέροντας το καλύτερο θρεπτικό προϊόν, χωρίς να υποβαθμίζεται η περιβαλλοντική του αξία και καθιστώντας το βιώσιμο (Ching X. L. et al., 2022)

### 5.2.2 Υδατοκαλλιέργεια

Οι κύριες εφαρμογές των μικροφυκών στην υδατοκαλλιέργεια σχετίζονται με τη διατροφή ως κύριο συστατικό ή ως πρόσθετο των σιτηρεσίων σε βασικά θρεπτικά συστατικά για την ενεργοποίηση άλλων βιολογικών δράσεων. Τα μικροφύκη είναι απαραίτητα για τη διατροφή των προνυμφών που θα χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ιχθυηρών μελλοντικά για την άμεση κατανάλωσή τους, όπως συμβαίνει στα μαλάκια και τις γαρίδες (Muller-Feuga A., 2000). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη είναι τα *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* και *Thalassiosira* (Εικόνα 5.2.1.). Ο συνδυασμός διαφορετικών ειδών φυκών παρέχει ισορροπημένη διατροφή και βελτιώνει την ανάπτυξη των ιχθυηρών - θαλασσινών καλύτερα από μια διατροφή που αποτελείται από ένα μόνο είδος φυκών (Spolaore P. C. et al., 2006). Οι προνύμφες των οργανισμών όπως τα μαλάκια στηρίζονται σε μικροφύκη καθ' όλη τη διάρκεια της πλαγκτονικής τους

φάσης ενώ εναλλακτικά μεταβαίνουν στη θήρευση ζωοπλαγκτού κατά τη διάρκεια της προνυμφικής ανάπτυξης με παράδειγμα τις γαρίδες.



***Chlorella vulgaris***

***Dunaliella salina***

***Isochrysis galbana***

**Εικόνα 5.2.1.:** Απεικόνιση από ορισμένα στελέχη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια.

Τα μικροφύκη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υδατοκαλλιέργεια ως μέσο εμπλουτισμού του ζωοπλαγκτού το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατροφή των ιχθυηρών και των προνυμφών τους (Chakraborty R. D. et al., 2007). Αυτό αντικατοπτρίζει την τεχνολογική πρόκληση και το υψηλό κόστος της παροχής θρεπτικά ισορροπημένων τροφών στη σωστή φυσική μορφή για τις μικρές πλαγκτονικές προνύμφες, των οποίων η πεπτική ικανότητα είναι μόνο εν μέρει ανεπτυγμένη. Πριν από τη δεκαετία του 1960 τα εκκολαπτήρια στις ιχθυοκαλλιέργειες χρησιμοποιούσαν εκτενώς τα τροχοφόρα (*Brachionus sp.*) ακολουθούμενα από τις γαρίδες (*Artemia sp.*) για την τροφή των προνυμφών των ιχθύων και των δεκάποδων (Bengtson D.A., 2003). Όμως αυτό το ζωοπλαγκτόν διαθέτει ελλιπή θρεπτική σύνθεση και δεν αποτελεί τη φυσική λεία των ειδών ιχθυοκαλλιέργειας. Παρ' όλα αυτά, οι γρήγοροι ρυθμοί αναπαραγωγής τους με υψηλές πυκνότητες είναι στις περισσότερες περιπτώσεις σημαντικότεροι από τις διατροφικές τους ελλείψεις (Lubzens E. et al., 2003). Για την αύξηση της διατροφικής ποιότητας των ιχθυηρών και των γαρίδων χρησιμοποιήθηκαν στελέχη μικροφυκών ή ενσωμάτωση αποξηραμένης βιομάζας μικροφυκών σε διαμορφωμένες δίαιτες, κυρίως μέσω της ενίσχυσης της με ω-3 ακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. HUFA, εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ και εικοσαπενταενοϊκό οξύ).

Σύμφωνα με τους Helm et al., 2004, τα στελέχη μικροφυκών *Bacillariophyte* και *Prymnesiophyte* αποτελούν μαζί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή τροφής για τα δίθυρα μαλάκια, τόσο για την εκτροφή σε εκκολαπτήρια όσο και κατά την προετοιμασία του γόνου τους. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στην υδατοκαλλιέργεια, ένα στέλεχος μικροφυκών πρέπει να πληροί διάφορα

κριτήρια, όπως η ευκολία στην καλλιέργεια, η έλλειψη τοξικότητας, η υψηλή θρεπτική αξία με σωστό μέγεθος και σχήμα κυττάρων και το εύπεπτο κυτταρικό τοίχωμα για να είναι διαθέσιμα τα θρεπτικά συστατικά στους θαλάσσιους οργανισμούς (Patil V. et al., 2007). Τα καλλιεργούμενα μικροφύκη είναι εδώ και πολύ καιρό αναντικατάστατα για την εκτροφή πολλών εμπορικά σημαντικών ειδών στις ιχθυοκαλλιέργειες.

Στην τεχνική του "πράσινου νερού" (Εικόνα 5.2.2.), τα μικροφύκη και το ζωπλαγκτόν αναπτύσσονται μέσα σε μεγάλες δεξαμενές, στις οποίες τοποθετούνται οι προνύμφες των ιχθυηρών. Αυτή η μέθοδος εκτροφής βασίζεται σε φυσικές συγκεντρώσεις μικροφυκών, οι οποίες ευνοούνται να αναπτυχθούν με την προσθήκη λιπασμάτων (Shields R.J., 2001). Εναλλακτικά, καλλιεργούμενα στελέχη μικροφυκών μπορούν να εμβολιαστούν σε δεξαμενές εκτροφής για το σκοπό αυτό, υπό την προϋπόθεση ότι το νερό του συστήματος έχει υποστεί προ επεξεργασία ώστε να αποκλείονται οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί. Η τεχνική εκτροφής σε "ψευδό-πράσινο νερό" βασίζεται αντίθετα στην τακτική προσθήκη καλλιεργούμενων μικροφυκών στις δεξαμενές εκτροφής των προνυμφών των ιχθυηρών, για την αναπλήρωσή τους. Η προσέγγιση αυτή απαιτείται για να διατηρηθούν υψηλότερες πυκνότητες εκτροφής των προνυμφών που είναι τυπικές στα περισσότερα εμπορικά εκτροφεία θαλάσσιων ψαριών. Τα στελέχη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον σκοπό αυτό είναι τα *Nannochloropsis sp.*, *Isochrysis sp.* και *Tetraselmis sp.*



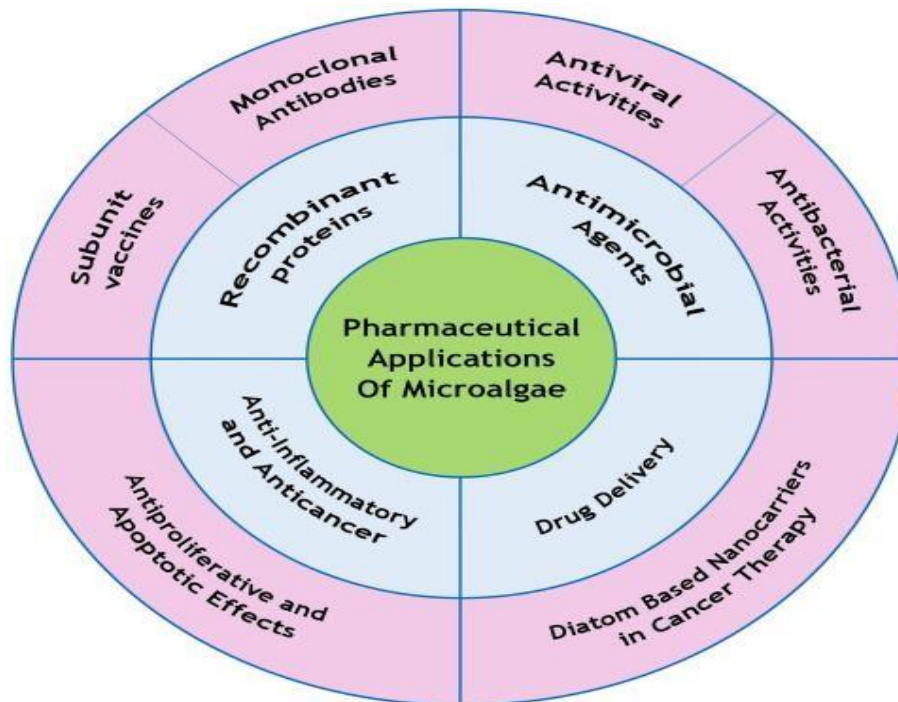
**Εικόνα 5.2.2.:** Τεχνηκή 'πράσινου νερού' με τη βοήθεια μικροφυκών για την καλλιέργεια της γαρίδας *Tiger*. (Α) Καλλιέργεια μικροφυκών σε ανοιχτές δεξαμενές (Β) Δεξαμενές μικρής κλίμακας για την καλλιέργεια γαρίδας με μικροφύκη, (Γ) Ανοιχτές λίμνες για μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια γαρίδας με τη βοήθεια μικροφυκών και (Δ) Γαρίδες τίγρης που καλλιεργούνται με τη χρήση τροφής από μικροφύκη (Dillirani Nagarajan et al., 2021)

Τα εμπορικά συμπυκνώματα μικροφυκών έχουν υιοθετηθεί ευρέως στις εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας. Από τη σκοπιά των ιχθυοτροφείων, τα βασικά επιθυμητά χαρακτηριστικά των συμπυκνωμάτων μικροφυκών είναι η υψηλή συγκέντρωση κυττάρων χωρίς βλάβες στα κύτταρά τους, η κατάλληλη θρεπτική σύνθεση, η αποδεκτή διάρκεια ζωής με τη χρήση μεθόδων ψυχρής αποθήκευσης, η αποφυγή χρήσης συντηρητικών που θα ήταν επιβλαβή για τα ζωντανά θηράματα, η απαλλαγή από παθογόνα, η αποφυγή συσσωμάτωσης και η εύκολη ομοιόμορφη αιώρηση στο νερό με τακτική διαθεσιμότητα και προσιτή τιμή. Για το σκοπό αυτό γίνεται η χρήση κατάλληλα βιομηχανικών στελεχών, όπως η ετερότροφα παραγόμενη *Chlorella sp.*, που είναι διαθέσιμη σε μεγαλύτερο όγκο και με χαμηλότερη τιμή. Η διαφορά απόδοσης μεταξύ των συμπυκνωμένων και των ζωντανών μικροφυκών είναι λιγότερο έντονη στον τομέα της παραγωγής ζωντανών θηραμάτων, όπου η βιομηχανικά παραγόμενη *Chlorella* χρησιμοποιείται πλέον συστηματικά για την παραγωγή τροχοφόρων και είναι ανταγωνιστική στην αγορά έναντι άλλων μορφών ξηράς τροφής (Tredici M. R. et al., 2009).

Όμως το υψηλό κόστος παραγωγής μικροφυκών παραμένει περιοριστικός παράγοντας για πολλά ιχθυοτροφεία παρόλη την εύρεση ιδανικών ειδών μικροφυκών που μπορούν να υποστηρίξουν τις βιομηχανίες αυτές (Lopez Elias J. et al., 2003). Εκτός από τη βελτίωση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας της επιτόπιας παραγωγής φυκών, μια εναλλακτική λύση είναι η συγκέντρωση της παραγωγής φυκών σε εξειδικευμένες εγκαταστάσεις μαζικής καλλιέργειας με τη χρήση ετερότροφων μεθόδων ή φωτοβιοαντιδραστήρων για την παραγωγή φθηνότερης βιομάζας φυκών. Αυτές οι τεχνολογίες θα μπορούσαν να συνδυαστούν με μετασυλλεκτική επεξεργασία, όπως η ξήρανση με ψεκασμό ή η συμπύκνωση φυκών, για την ανάπτυξη έτοιμης βιομάζας και τη διανομή της σε ιχθυοκαλλιέργειες (Lopez Elias J. et al., 2003). Αν και τα γενετικά τροποποιημένα μικροφύκη έχουν μελετηθεί για την εφαρμογή τους στην παραγωγή βιοκαυσίμων και τη βιοεξυγίανση βαρέων μετάλλων, υπάρχει λιγότερη έρευνα για την εφαρμογή τους στην υδατοκαλλιέργεια. Η εισαγωγή γονιδίων που καθορίζουν τις διατροφικές παραμέτρους στα μικροφύκη μπορεί να αυξήσει την ποιότητα των ιχθυηρών στην υδατοκαλλιέργεια (Sayre R. T. et al., 2001). Μια συνδυασμένη προσπάθεια για την τυποποίηση ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους μικροφυκών με τη βοήθεια ενός ελεγχόμενου συστήματος βιοεπεξεργασίας θα οδηγήσει σε βελτίωση της κατάστασης της υδατοκαλλιέργειας.

### 5.3 Φαρμακευτικά προϊόντα και ανάπτυξη φαρμάκων

Ένας ακόμα τομέας στον οποίο βρίσκουν εφαρμογή τα μικροφύκη μέσω των ουσιών που παράγουν είναι αυτός της φαρμακευτικής βιομηχανίας (Εικόνα 5.3.1.) καθώς είναι ικανά να παράγουν βιοδραστικές ενώσεις, όπως μονοκλωνικά αντισώματα, ηπατοτοξικές και νευροτοξικές ενώσεις, ορμόνες, ένζυμα, και άλλες ενώσεις με φαρμακευτικές και θεραπευτικές εφαρμογές οι οποίες δεν συντίθενται εύκολα με συνθετικές μεθόδους αλλά και να χρησιμοποιηθούν σε αντιβιοτικά και εμβόλια (Rizwan M. et.al, 2018).



**Εικόνα 5.3.1.:** Συγκεντρωτική εικόνα των εφαρμογών των συστατικών των μικροφυκών στον τομέα της φαρμακευτικής (Fatemeh Khavari ,2021)

Οι χρωστικές ουσίες των μικροφυκών έχουν επίσης οφέλη για την υγεία, όπως η πρόληψη του καρκίνου, των καρδιακών παθήσεων, και των νευρολογικών διαταραχών. Με την άνοδο της βιοτεχνολογίας μπορούν να παράγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεδομένων των μοναδικών τους ιδιοτήτων, όπως ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης και το χαμηλό κόστος, ενώ οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους είναι παρόμοιες με τα κύτταρα των θηλαστικών σε αντίθεση με τα βακτηριακά κύτταρα (Ramana KV et al., 2017). Το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι το πιο δημοφιλές στη φαρμακευτική βιοτεχνολογία με αντισώματα, εμβόλια, την ερυθροποιητίνη και την ιική πρωτεΐνη 28 (VP 28) να παράγονται σε αυτό. Τα *Chlorella*, *Dunaliella*, και *Scenedesmus* είναι άλλα είδη που θα μπορούσαν να παράγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (Yan N. et al., 2016).

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τα εμβόλια, τα μικροφύκη (ιδίως το *C. reinhardtii*) είναι βιώσιμες επιλογές για να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς εμβολίων, καθώς είναι ασφαλή και περιέχουν έναν μονό χλωροπλάστη, ο οποίος εκφράζει πρωτεΐνες σε υψηλή συγκέντρωση. Τέτοια παραδείγματα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι η πρωτεΐνη E2, η οποία χρησιμοποιείται στα εμβόλια κατά του ιού της πανώλης των χοίρων, η πρωτεΐνη σύντηξης D2-CTB (D2 φμπρονεκτίνη του *S. aureus* που περιέχει την τοξίνη B της χολέρας), η οποία χρησιμοποιείται στο δια του στόματος εμβόλιο κατά του *S. aureus*, και η ογκοπρωτεΐνη E7, η οποία εφαρμόζεται στο εμβόλιο κατά του HPV (Yan N. et al., 2016). Τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται στην Κίνα σε κυτταρικές σειρές ωθηκών



χάμστερ και είναι ιδιαίτερα δαπανηρά και υπάρχει ο κίνδυνος μόλυνσής τους με ανθρώπινους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Λόγω των πλεονεκτημάτων τους, τα μικροφύκη θεωρούνται αποτελεσματικά εναλλακτικά κύτταρα-ξενιστές. Αυτοί οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι ανώτεροι από τα βακτηριακά κύτταρα όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, προτιμώνται από άλλους ευκαρυωτικούς ξενιστές λόγω του υψηλού τους ρυθμού ανάπτυξης, τον εύκολο χειρισμό τους και την απλή καλλιέργεια. Οι Hampel et al. παράγαγαν ένα μονοκλωνικό- IgG αντίσωμα σε τροποποιημένα στελέχη του *Phaeodactylum tricornutum* έναντι της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού Μάρμπουργκ, ο οποίος αποτελεί την κύρια αιτία του αιμορραγικού πυρετού στη δυτική Αφρική (Hempel F. et al., 2017).

Αρκετά εκχυλίσματα μικροφυκών φέρουν αντιικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιπρωτοζωικές ιδιότητες. Τέτοια παραδείγματα είναι οι ινδόλες, οι φαινόλες, τα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, τα γαλαζοπράσινα φύκια όπως το *Ochromonas sp.* και το *Prymnesium parvum* παράγουν τοξίνες με φαρμακευτικές ιδιότητες (Rizwan M. et al., 2018). Οι αντιικές ενώσεις των μικροφυκών επηρεάζουν διάφορα στάδια των ιογενών λοιμώξεων. Για παράδειγμα, οι θειούχοι πολυσακχαρίτες παρεμβαίνουν στην πρώτο στάδιο της μόλυνσης (Mostafa SS, 2012). Σε μια σχετική μελέτη το 2019, οι Hayashi et al. κατάφεραν να εξάγουν μια μονογαλακτοζυλική διακυλογλυκερόλη (MGDG) από *Coccomyxa sp.*, η οποία προκάλεσε φυσικές αλλαγές στον πρωτεϊνικό φάκελο του HPV με αποτέλεσμα, ο ιός να μην μπορούσε να προσκολληθεί στον ξενιστή, υποδεικνύοντας τις αντιικές επιδράσεις της MGDG (Hayashi K. et al., 2019).

Ένας ακόμα τομέας που αναμένεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο είναι αυτός στον τομέα των αντιβακτηριακών ουσιών και στη δημιουργία νέων αντιβιοτικών. Σε μια μελέτη, παράγαγαν ένα μείγμα λιπαρών οξέων από τη *Chlorella*, το οποίο ασκούσε ανασταλτικές επιδράσεις στα βακτήρια. Παρατηρήθηκε ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που εξάγονται από τα μικροφύκη είναι ικανά να θανατώνουν ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Εκτός από την αντιβακτηριακή δράση των μικροφυκών, οι βιοενώσεις αυτές έχουν επιδείξει και αντιβιοτική δράση. Για παράδειγμα, ο *Streptococcus mutans* και ο *Lactobacillus sp.* είναι δύο βακτήρια που σχηματίζουν βιοφίλμ στα δόντια και προκαλούν το σχηματισμό οδοντικής πλάκας. Εκχυλίσματα από τα *C. vulgaris* και *D. salina* θα μπορούσαν να αναστείλουν το σχηματισμό βιοφίλμ και να αποτρέψουν την οδοντική τερηδόνα (Mostafa SS, 2012) ενώ λιπαρά οξέα που εξάγονται από το *Haematococcus pelvis* έχουν αντιβακτηριακή δράση έναντι του *E. coli* και του *S. aureus* (Santoyo S. et al., 2009). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η αντιβιοτική δράση σχετιζόταν με την παρουσία

φαινολικών ενώσεων και χρωστικών ουσιών, όπως το β-καροτένιο και η χλωροφύλλη II (Mostafa SS, 2012)

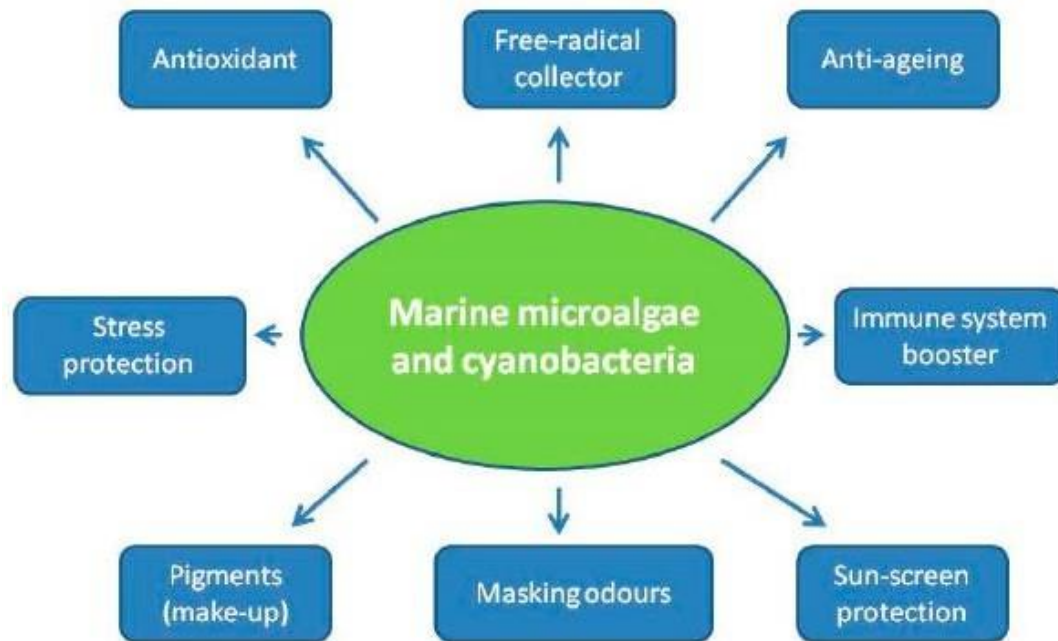
Ορισμένοι υδατάνθρακες, λιπίδια και φυκοβιλοπρωτεΐνες που εξάγονται από τα μικροφύκη έχουν δείξει αντιπολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές επιδράσεις σε διάφορους καρκίνους. Το φουκοϊδάνιο είναι ένας θειούχος πολυσακχαρίτης, ο οποίος εξάγεται από διάφορα μικροφύκη, όπως το *Fucus vesiculosus*, το *Sargassum henslowianam*, *Cladosiphon fucoidan*, και *Coccolophora longsdorfii*, τα οποία αναστέλλουν την αγγειογένεση και τη μετάσταση μέσω της αρνητικής ρύθμισης της δραστηριότητας της κινάσης και της ενεργοποίησης της κασπάσης-3/7 στο ανθρώπινο λέμφωμα, μελάνωμα, καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο του μαστού, καρκίνωμα του πνεύμονα και την λευχαιμία (Deniz I. et al., 2017).

Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν σχεδιαστεί για να μεταφέρουν τα φάρμακα ή τα γονίδια στα κύτταρα-στόχους, όπως τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι έχουν γίνει μελέτες για τη δημιουργία μικρό-/νανοφορέων με βάση τα μικροφύκη για τη χορήγηση φαρμάκων. Οι πολυσακχαρίτες των μικροφυκών θα μπορούσαν να μετατραπούν σε νανοσωματίδια (NPs) και να χρησιμοποιήσουν τις υδρόφιλες ομάδες που εδρεύουν στην κυτταρική μεμβράνη για να αλληλοεπιδράσουν με βιομόρια (Shankar PD et al., 2016). Τα διάτομα αφήνουν απολιθώματα γνωστά ως «γη διατόμων» (DE) ή απολιθώματα, τα οποία χρησιμεύουν ως πηγή πορωδών νανοσωματιδίων διοξειδίου του πυριτίου (SiO<sub>2</sub> NPs). Τόσο τα ζωντανά διάτομα όσο και τα DE θεωρούνται πηγές νανοσωματιδίων πυριτίου. Τα νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου μπορούν να τροποποιηθούν με κατιονικά αντιδραστήρια. Η τροποποίηση αυτή χρησιμοποιείται για σκοπούς γονιδιακής μεταφοράς. Η χρήση των νανοσωματιδίων στην παράδοση γονιδίων αναδεικνύει τις πιθανές εφαρμογές τους στη βιοτεχνολογία και την ιατρική, αξιοποιώντας τις μοναδικές ιδιότητες του πυριτίου που προέρχεται από τα διάτομα για την ενίσχυση των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων ή άλλων εφαρμογών που σχετίζονται με τη βιολογία (Deniz I. et al., 2017). Περεταίρω τροποποιήσεις θα μπορούσαν να μεταβάλουν και να βελτιώσουν τις ιδιότητες DE, και τη δημιουργία διατομικών μικροκαψουλών να καθιστούν τους παράγοντες αυτούς φορείς που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα για τη χορήγηση αντιβιοτικών. Άλλο παράδειγμα είναι η χρήση φυσικών NP διοξειδίου του πυριτίου που προέρχονται από το *Coscinodiscus concinnus* (διάτομο) για τη χορήγηση στρεπτομυκίνης (υδρόφιλο φάρμακο), παρατηρώντας ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου του επεξεργασμένου διατόμου παρατάθηκε σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα διάτομα. Επιπλέον, η στρεπτομυκίνη προσροφήθηκε στο εσωτερικό των πόρων του διατόμου λόγω της επιφανειακής προσρόφησης (Gnanamoorthy P. et al., 2014).

Χρήση συνθετικών NPs για τη χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων είναι μια σημαντική προσέγγιση για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας. Ωστόσο, τα υλικά αυτά μπορεί να είναι τοξικά και να έχουν ορισμένα περιβαλλοντικά μειονεκτήματα. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση βιοδιασπώμενων NP πυριτίου (SiNPs) έχει αντικατασταθεί με μικροφύκη, τα οποία έχουν οικονομικά αποδοτική παρασκευή και χαμηλή τοξικότητα. Αρκετές ενώσεις που προέρχονται από μικροφύκη παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες και αποτελούν μια βιώσιμη επιλογή για τη θεραπεία του καρκίνου. Παρ' όλα αυτά, οι αντικαρκινικές ουσίες που βασίζονται σε φυσικές ενώσεις (π.χ. καμπθοεκίνη) έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Οι βιοδραστικές ενώσεις των γαλαζοπράσινων φυκών μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση και να ενεργοποιήσουν την οικογένεια της πρωτεϊνικής κινάσης-c στα καρκινικά κύτταρα (Khalifa SA et al., 2019). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα NPs από διάτομα πυριτίου (DSNs) είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα DSNs είναι επίσης αποτελεσματικοί νανοφορείς για την πρόσληψη αντικαρκινικών μορίων από τα κύτταρα του επιδερμικού καρκινώματος (Ruggiero I. et al., 2014).

#### 5.4 Καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής ομορφιάς

Οι βιοδραστικές ουσίες τις οποίες συνθέτουν τα μικροφύκη είναι και στον τομέα των καλλυντικών και της προσωπικής ομορφιάς πολύ σημαντικές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.4.1.. Η περιεκτικότητά τους σε λιπίδια παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία καλλυντικών ενώ σημαντικές είναι επίσης και οι βιταμίνες τους (A, B1, B2, B6, B12, C), οι χρωστικές ουσίες, ιδίως τα καροτενοειδή (β-καροτένιο, λυκοπένιο, κρυπτοξανθίνη, κανθαξανθίνη, ασταξανθίνη,) και οι φυκοπρωτεΐνες. Τα μικροφύκη που είναι πλούσια σε αμινοξέα, ιδιαίτερα σε σερίνη, και ανήκουν στο γένος *Thalassiosira*, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για προϊόντα ενυδάτωσης, αλλά και εκείνα που είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το *Monodus subterraneus* (Cardozo K. H. M. et al., 2007). Σε γενικές γραμμές, η ικανότητα αποκατάστασης της επιδερμικής απώλειας νερού σε κανονική κατάσταση ανήκει στην οικογένεια ω-6 των απαραίτητων λιπαρών οξέων (EFAs) και συγκεκριμένα στα λιπαρά οξέα με 18 άτομα άνθρακα, το λινολεϊκό οξύ και το γ-λινολενικό οξύ. Τα μικροφύκη που ανήκουν στο γένος *Nannochloropsis* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λινολενικό οξύ (Guedes A. et al., 2011).



**Εικόνα 5.4.1.:** Τομείς εφαρμογής ων ενεργών συστατικών που προέρχονται από θαλάσσια μικροφύκη και κυανοβακτήρια στη φροντίδα του δέρματος και τα καλλυντικά (Mourelle M. L. et al., 2017).

Μια από τις πιο πρόσφατες καινοτομίες στον τομέα της αντιγήρανσης αφορά τα προϊόντα Algenist της εταιρείας Solazyme, τα οποία παρασκευάζονται με τη χρήση αλγουρονικού οξέος που πρόκειται για ένα μείγμα πολυσακχαριτών που παράγεται από ένα μικροφύκος και κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας με αυτή τη γενική ονομασία από την εταιρεία. Είναι ικανό να διεγείρει την ανανέωση των κυττάρων και να προάγει τη σύνθεση ελαστίνης (Bloch J. F. & Tardieu-Guigues E., 2014). Υπάρχει επίσης ένας πολυσακχαρίτης που εξάγεται από το *Porphyridium sp.* που προτείνεται για τη θεραπεία μικρών ρυτίδων. Είναι επίσης γνωστό ότι ενισχύει την ενυδάτωση του δέρματος αυξάνοντας τη λειτουργία του φραγμού του. Η Daniel Jouvance Laboratories έκανε μια πρωτότυπη επιλογή χρησιμοποιώντας το βιοφωσφορίζον μικροφύκος *Pyrocystis noctulica* για τη σύνθεση του προϊόντος Eclaceane. Ο βιοφωτισμός είναι ένα γνωστό φαινόμενο που προκύπτει λόγω της παρουσίας της λουσιφερίνης και της λουσιφεράσης. Η επίδραση στο δέρμα οφείλεται στις λαμπερές ιδιότητες αυτού του είδους (Cussatlegras A. S. & Le Gal P., 2004). Επιπλέον ένα εκχύλισμα του *Chlorella vulgaris* είναι πολλά υποσχόμενο στον τομέα της αντιγήρανσης, καθώς φαίνεται να ενισχύει τη σύνθεση του κολλαγόνου (Wang H. M. D. et al., 2015).

Οι έρευνες για τη χρήση εκχυλισμάτων μικροφυκών σε αντηλιακά δεν είναι πολύ δραστικές. Ωστόσο, έχουν ανιχνευθεί αμινοξέα που μοιάζουν με μυκοσπόρια (MAAs) σε μικροφύκη καθαρού νερού, *Arhanizomenon flos-aquae* (Scoglio S. et al., 2014). Είναι γνωστό ότι οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι σε θέση να συσσωρεύουν μόρια που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία UVB. Αυτές οι ενώσεις,

που ονομάζονται MAAs, έχουν μέγιστη απορρόφηση στην υπεριώδη ακτινοβολία μεταξύ 310 και 360 nm μήκους κύματος (Xiong F. et al., 1999). Υπάρχει ενδιαφέρον για την έρευνά τους, ειδικά σε ορισμένα είδη διμαστιγωτών που αποκαλύπτουν ένα καλό δυναμικό σε MAAs (Taira H. et al., 2004). Εκτός αυτού, ένα εκχύλισμα του *Phaeodactylum tricornutum* προτείνεται από την εταιρεία Soliance για την πρόληψη της φωτοπροκλητής γήρανσης που περιορίζει τη συσσώρευση επιβλαβών πρωτεϊνών στο δέρμα.

Δεδομένου ότι η χρήση της υδροκινόνης σε καλλυντικά προϊόντα για το δέρμα απαγορεύεται από την 1η Μαρτίου 2000, λόγω των πολυάριθμων ανεπιθύμητων επιπτώσεών της, ποικίλες έρευνες μελετούν την εύρεση υποκατάστατων της. Καθώς η τυροσινάση είναι το βασικό ένζυμο για τη σύνθεση της μελανίνης, οι ερευνητές αναζητούν φυσικούς αναστολείς του ενζύμου. Ένα εκχύλισμα του *Nannochloropsis oculata* φαίνεται να παρουσιάζει ενδιαφέρον σε αυτόν τον τομέα (Shen C. T. et al., 2011). Η εταιρεία Codif προσφέρει ένα εκχύλισμα με βάση τη *Chlorella* που οδηγεί σε 10% μείωση της μελάγχρωσης του δέρματος.

Άλλες χρωστικές ουσίες από μικροφύκη, όπως η χλωροφύλλη, μπορούν εύκολα να εξαχθούν (Hosikian A. et al., 2010) και να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικά, για παράδειγμα, σε αποσμητικά, λόγω της ικανότητάς τους να καλύπτουν τις οσμές, καθώς και σε οδοντόκρεμες και προϊόντα υγιεινής. Υπάρχει επίσης ενδιαφέρον για τη χρήση ορισμένων χρωστικών ουσιών σε σκευάσματα μακιγιάζ όπως οι φυκοκυανίνες, που παράγονται από θερμοφιλά γαλαζοπράσινα φύκια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση σκιών για μάτια (Bermejo R. et al., 2003) και τα ροζ και μωβ χρώματα που περιλαμβάνονται στα καλλυντικά θα μπορούσαν επίσης να παρασκευαστούν από φυσικές χρωστικές ουσίες που εξαγονται από τα κόκκινα μικροφύκη (Arad S. et al., 1992).

## Κεφάλαιο 6: Σημερινές προκλήσεις και μελλοντικές κατευθύνσεις

### 6.1 Τεχνολογικές προκλήσεις

Η χρήση μικροφυκών παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές εφαρμογές. Αρχικά, η συγκομιδή μικροφυκών σε μεγάλες ποσότητες έχει αρκετούς πρακτικούς περιορισμούς. Επιπλέον, υπάρχει η πιθανότητα βακτηριακής μόλυνσης σε καλλιέργεια μικροφυκών σε ανοικτά συστήματα καλλιέργειας. Τέτοια είδους βακτήρια ενδέχεται να είναι τοξικά, γεγονός που επηρεάζει την ανάπτυξη και την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών. Επίσης, η εμπορική αξιοποίηση των μικροφυκών και των παραγώγων τους σε μεγάλο εύρος βρίσκεται ακόμα σε χαμηλά επίπεδα, παρουσιάζοντας ορισμένες σημαντικές προκλήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν: (1) χαμηλή παραγωγική ικανότητα, (2) υψηλό κόστος παραγωγής, (3) έντονο (γενικά πράσινο) χρώμα και ιχθυώδη γεύση και άρωμα και (4) νομοθετικά και ρυθμιστικά ζητήματα (Lafarga T., 2019). Η τεχνολογία της καλλιέργειας και της επεξεργασίας των μικροφυκών βρίσκεται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο (περίπου 100 χρόνια) σε σύγκριση με άλλες πηγές που βασίζονται σε καλλιέργειες (πάνω από 5000 χρόνια), με τις διαδικασίες συγκομιδής και αφυδάτωσης να επιβαρύνουν το κόστος παραγωγής. Τα τρέχοντα συστήματα και οι τρέχουσες τεχνολογίες χρειάζονται περαιτέρω ανάπτυξη και βελτιστοποίηση για την επίτευξη βιωσιμότητας των μικροφυκών και βελτιωμένης οικονομικής παραγωγής τους (Smetana S. et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, τα μικροφύκη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο περιβάλλον τους, απαιτώντας συγκεκριμένες συνθήκες για βέλτιστη ανάπτυξη. Παράγοντες όπως η ένταση του φωτός, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και τα επίπεδα pH διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην καλλιέργειά τους. Η επίτευξη και η διατήρηση των συγκεκριμένων συνθηκών σε μεγάλη κλίμακα αποτελεί μια πρόκληση. Η δημιουργία και η χρήση προηγμένων συστημάτων παρακολούθησης και οι στρατηγικές ελέγχου θα οδηγήσουν στη δημιουργία σταθερών και βελτιστοποιημένων καλλιεργειών για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών μικροφυκών είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων του κάθε προϊόντος. Διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν ποικίλους ρυθμούς ανάπτυξης, περιεκτικότητα σε λιπίδια και αντοχή στο περιβαλλοντικό στρες. Για αυτό το λόγο απαιτείται η χρήση προηγμένων τεχνικών διαλογής και γενετική ανάλυση για τον εντοπισμό και την απομόνωση στελεχών με βέλτιστα χαρακτηριστικά για συγκεκριμένες εφαρμογές (Sukla L.B. et al., 2015). Επιπλέον, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η μετάβαση από την καλλιέργεια σε εργαστηριακό επίπεδο για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μικροφυκών παρουσιάζει προκλήσεις όσον αφορά την εφοδιαστική αλυσίδα, τις υποδομές και τη διαχείριση των πόρων. Η επίτευξη κέρδους μεγάλης κλίμακας με ταυτόχρονη διατήρηση της ακεραιότητας της διαδικασίας της

καλλιέργειας, η οποία σημαίνει τη διατήρηση της ποιότητας του εδάφους, της βιοποικιλότητας και άλλων παραμέτρων περιβαλλοντικής αειφορίας, απαιτεί προσεκτική διαχείριση. Οι συνεχείς εξελίξεις στη μηχανική και η βελτιστοποίηση της διαδικασίας είναι απαραίτητες για τον εξορθολογισμό της παραγωγής και την οικονομική βιωσιμότητα της καλλιέργειας μικροφυκών σε μεγάλη κλίμακα (Sukla L.B. et al., 2015).

Αν και η γενετική μηχανική έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της σύνθεσης των βιοδραστικών μεταβολιτών στα μικροφύκη, εξακολουθεί να υπάρχει μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού που δεν αποδέχεται τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (Paull J., 2013). Άλλη πρόκληση σχετικά με τη λειτουργικότητα των βιοδραστικών ενώσεων με βάση τα μικροφύκη είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των οφελών τους για την υγεία αναφέρονται σε *in vitro* μελέτες που μιμούνται τον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, που όμως δεν αντικατοπτρίζει πλήρως την πραγματικότητα. Έτσι, είναι πολύ σημαντικό να διεξάγονται κλινικές μελέτες *in vivo* όχι μόνο για την αποσαφήνιση της βιοπροσβασιμότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και των βιολογικών επιπτώσεων των βιοδραστικών τους ενώσεων, αλλά και για την επιβεβαίωση ότι δεν υπάρχουν παρενέργειες κατά την κατανάλωση. Επισημαίνεται ότι η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως ο συνδυασμός βιοδραστικότητας και βιοπροσβασιμότητας με τη βιοδραστικότητα να είναι η διαδικασία πρόσληψης θρεπτικών ουσιών από τους οργανισμούς και τα αποτελέσματά της στον μεταβολισμό τους. Ο όρος βιοπροσβασιμότητα αναφέρεται στη μεταφορά θρεπτικών ουσιών μέσω της πεπτικής οδού και την απελευθέρωση των συστατικών των τροφίμων στον οργανισμό (Carbonell-Capella JM et al., 2014).

Επιπλέον, στις περισσότερες αισθητηριακές μελέτες, η αποδοχή των τροφίμων με βιομάζα μικροφυκών είναι υψηλή, όμως μειώνεται όταν η ενσωμάτωση της βιομάζας μικροφυκών αυξάνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Lafarga T. et al., 2019). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών, κυρίως το χρώμα και η γεύση, έχουν συνήθως αρνητικό αντίκτυπο στους καταναλωτές, περιορίζοντας την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα καθημερινής χρήσης (Carorgno M.P. & Mathys A., 2018).

Τα δύο βασικά συστήματα καλλιέργειας, οι φωτοβιοαντιδραστήρες και οι ανοικτές δεξαμενές, αντιμετωπίζουν διαφορετικές και σημαντικές προκλήσεις. Οι φωτοβιοαντιδραστήρες προσφέρουν ελεγχόμενα περιβάλλοντα, αλλά έχουν υψηλό κόστος κατασκευής και συντήρησης. Από την άλλη πλευρά, οι ανοικτές δεξαμενές είναι οικονομικά αποδοτικές αλλά αντιμετωπίζουν προβλήματα όπως η μόλυνση, η ανομοιόμορφη κατανομή του φωτός και οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Ως εκ τούτου, είναι πράγματι αναγκαίο να αντιμετωπιστούν αυτές οι προκλήσεις σχετικά με την ασφάλεια της βιομάζας και την οικονομική βιωσιμότητα και να αναπτυχθούν μέθοδοι συγκομιδής για τη διευκόλυνση της παραγωγής (L.B. Sukla et al., 2015). Συνεπώς, απαιτούνται προσπάθειες για την

επίλυση των προβλημάτων που αντιμετωπίζουν οι βιομηχανίες που χρησιμοποιούν μικροφύκη. Συνοψίζοντας οι σημαντικότερες προκλήσεις είναι:

- Υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας
- Έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας
- Μικροβιακή μόλυνση του μέσου
- Μη ισορροπημένη παροχή φωτός και καιρικών συνθηκών.

## 6.2 Κανονιστικές υποθέσεις και θέματα ασφάλειας

Η ασφάλεια των τροφίμων σε διεθνές επίπεδο διέπεται από την Επιτροπή Codex Alimentarius Commission (CAC), η οποία δημιουργήθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Ο Codex Alimentarius είναι μια συλλογή διεθνώς αναγνωρισμένων προτύπων, με κώδικες πρακτικής, κατευθυντήριες γραμμές και άλλες συστάσεις σχετικά με την παραγωγή και την ασφάλεια των τροφίμων. Στην περίπτωση των πρόσθετων τροφίμων και των νέων τροφίμων (συμπεριλαμβανομένων των τροφοφαρμάκων (nutraceuticals) και λειτουργικών τροφίμων), οι νόμοι και οι κανονισμοί διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) έχει ορίσει τα προϊόντα με βάση τα μικροφύκη ως «άλλα συμπληρώματα διατροφής» με την κατανάλωση στελεχών όπως *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *C. cohnii*, *P. cruentum* και *Schizochytrium* να τους αποδίδει τον χαρακτηρισμό ως "Γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές". Σε σύγκριση με τις Ηνωμένες Πολιτείες, άλλες χώρες όπως ο Καναδάς, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία εγκρίνουν την κατανάλωση περιορισμένων στελεχών μικροφυκών συμπεριλαμβανομένης της σπιρουλίνας και της χλωρέλλας (Garcia J. L. et.al, 2017). Στην Ευρώπη, τα τρόφιμα που αποτελούνται από καλλιέργειες κυττάρων ή ιστών που προέρχονται από μικροοργανισμούς, μύκητες ή φύκια, ή τρόφιμα που παράγονται από τους αναφερόμενους οργανισμούς, κατηγοριοποιούνται ως νέα τρόφιμα, θεωρώντας ότι οι ουσίες αυτές δεν έχουν ευρεία συμμετοχή στη διατροφή των κατοίκων σημαντικά στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) πριν από το 1997.

Κάθε κράτος μέλος της ΕΕ διαθέτει μια αρμόδια αρχή που προβαίνει σε μια πρώτη αξιολόγηση των νέων προϊόντων και χρειάζεται τελική έγκριση από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, ακολουθώντας πάντοτε τον κανονισμό 2015/2283 (ΕΚ) που αναφέρεται ως κανονισμός για τα νέα τρόφιμα. Σε περίπτωση που υπάρχουν αντιρρήσεις για το προϊόν, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) είναι υπεύθυνη για τη διενέργεια της αξιολόγησης της ασφάλειας των νέων τροφίμων (van der Spiegel, Noordam, & van der Fels-Klerx, 2013). Σε πολλές αγορές, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας φυκών, η πιστοποίηση και η συμμόρφωση με την ορθή παρασκευαστική πρακτική (GMP) και το ISO 9001/2000 είναι απαραίτητες από τους οργανισμούς που ελέγχουν την εξουσιοδότηση και την



αδειοδότηση για νέα προϊόντα. Στην περίπτωση τροφίμων και των συναφών βιομηχανιών, η ανάλυση κινδύνων και τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) συνίστανται ιδιαίτερα. Στον Πίνακα 6.2.1. αποτυπώνονται είδη μικροφυκών που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα τα οποία χαρακτηρίζονται από τον FDA ως όχι τοξικό και ως ασφαλές:

**Πίνακας 6.2.1.: Χαρακτηρισμός ασφάλειας για χρήση μικροφυκών σε τρόφιμα από τον FDA (Enzing C. et al 2014).**

<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ</b>	<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΑΣΦΑΛΕΙΑ</b>
<b>ΠΡΑΣΙΝΑ ΦΥΚΗ</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Όχι τοξικό
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Ασφαλές
	<i>Dunaliella salina</i>	Όχι τοξικό
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Όχι τοξικό
	<i>Scenedesmus</i> sp.	Όχι τοξικό
	<i>Tetraselmis</i> sp.	Όχι τοξικό
<b>ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>	<i>Spirulina (Arthrospira)</i>	Ασφαλές
	<i>Synechococcus</i> sp.	Όχι τοξικό
<b>ΔΙΝΟΦΥΚΗ</b>	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Ασφαλές
<b>ΑΠΤΟΦΥΤΑ</b>	<i>Isochrysis galbana</i>	Όχι τοξικό
	<i>Pavlova</i> sp.	Όχι τοξικό
<b>ΕΝΤΕΡΟΚΟΝΤΟΦΥΤΑ</b>	<i>Nitzschia dissipata</i>	Όχι τοξικό
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Όχι τοξικό
	<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Όχι τοξικό
	<i>Skeletonema</i> sp.	Όχι τοξικό
	<i>Schizochytrium</i>	Ασφαλές

**ΡΟΔΟΦΥΤΑ***Thalassiosira pseudonoma*

Όχι τοξικό

*Porphyridium cruentum*

Ασφαλές

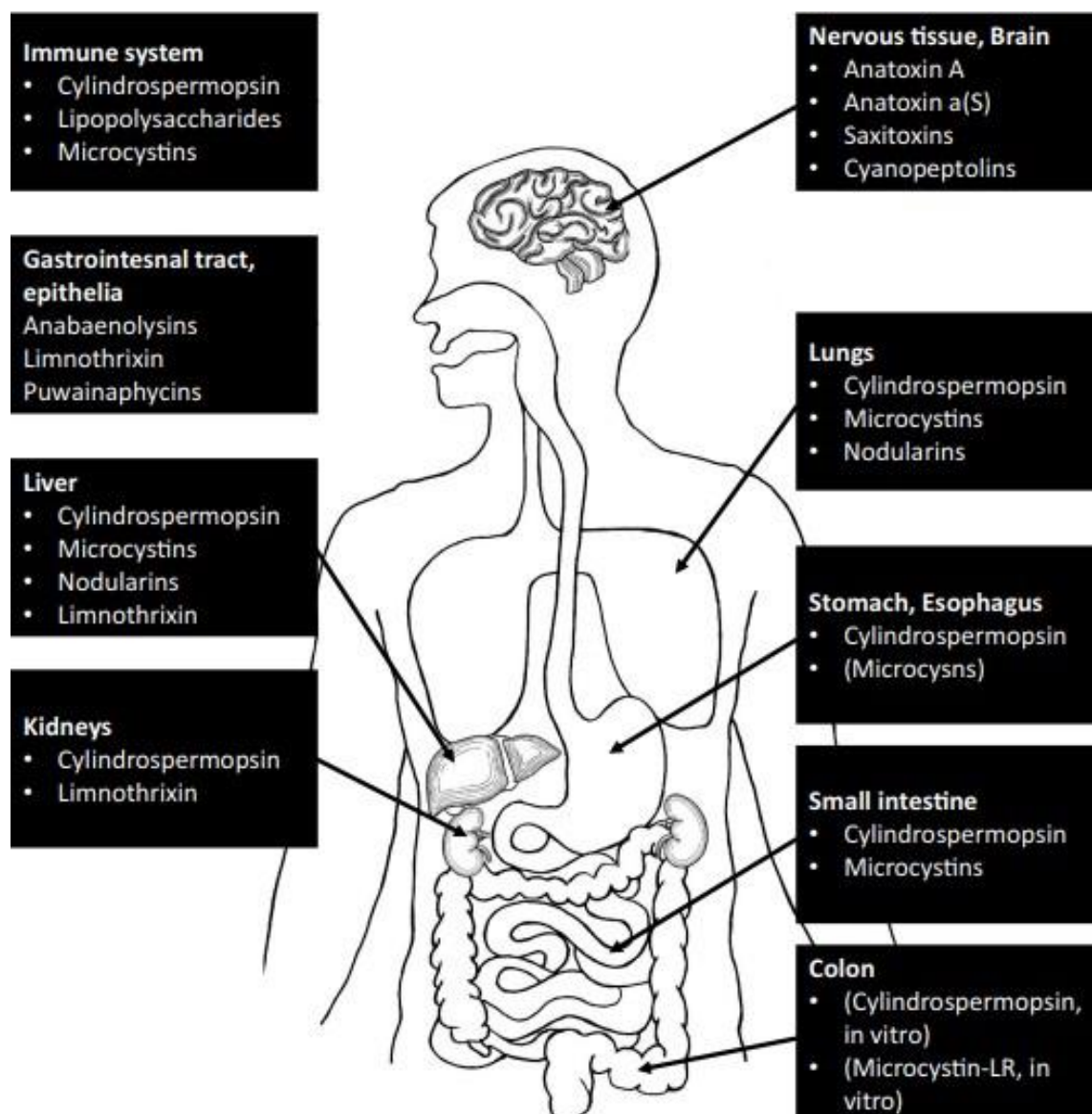
Η εφαρμογή μικροφυκών, είτε ως άμεσο συμπλήρωμα διατροφής ή ως συστατικά σε τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής, εξακολουθεί να βρίσκονται σε πρώιμα στάδια λόγω ζητημάτων σχετικά με τη βιομηχανική παραγωγή, κανονιστικές υποθέσεις και διατροφικά ζητήματα ασφαλείας (Borowitzka MA, 2013). Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά τη χρήση μικροφυκών στη βιομηχανία τροφίμων είναι η πέψη και βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών που προέρχονται από τη βιομάζα μικροφυκών, η τοξικότητα μετάλλων, οι πιθανοί αλλεργιογόνοι παράγοντες, οι τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, οι συνθετικές ενώσεις όπως οι κυανοτοξίνες, τα ραδιοϊσότοπα, η μόλυνση της βιομάζας με παθογόνα καθώς και οι κανονισμοί ασφαλείας (Wells ML et al., 2017).

Οι περισσότερες διαθέσιμες ερευνητικές εργασίες επικεντρώνονται σε βραχυπρόθεσμα πειράματα στην *in vitro* μελέτη της βιοδραστικότητας των τροφίμων φυκών στα οποία η πλήρης διατροφική αξία των θρεπτικών συστατικών των φυκών είναι περιορισμένη. Επιπλέον, απαιτείται περαιτέρω μελέτη των συστατικών αυτών των τροφίμων και της απορρόφησής τους από το έντερο. Ορισμένες μελέτες έδειξαν πως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες από τα μικροφύκη προκαλούσαν δυσπεψία στους καταναλωτές και οδήγησαν σε ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του εντέρου και ανοσολογικές αποκρίσεις στους ανθρώπους (Thomas F. et al., 2012). Το μικροβίωμα του εντέρου δεν είναι όμοιο σε όλους τους ανθρώπους και η ζύμωση των πολυσακχαριτών φυκών διαφέρει στους ανθρώπους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι Ιάπωνες στους οποίους υπάρχει η παρουσία ενζύμων που αποικοδομούν πολυσακχαρίτες τα οποία οφείλονται στο *Bacteroides plebeius* το οποίο απουσιάζει στους Αμερικανούς (Hehemann JH et al., 2012). Παρόμοια με τα φυτά, τα μικροφύκη έχουν και αυτά περίπλοκο κυτταρικό τοίχωμα και είναι δύσκολη η αποδόμησή τους κατά την πρόσληψη. Ως εκ τούτου, οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας στοχεύουν στην κατανόηση της επεξεργασίας και της απορρόφησης των μεταβολιτών και των συστατικών από τα τρόφιμα που περιέχουν βιομάζα μικροφυκών. Είναι επίσης σημαντικό να μελετηθεί ο μεταβολισμός του ανθρώπου συναρτήσει του εντερικού μικροβιώματος (Wells ML et al., 2017). Η διαθέσιμη βιβλιογραφία που σχετίζεται με τα μικροφύκη, τα θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από αυτά (nutraceuticals) και με τα λειτουργικά τρόφιμα είναι ευρεία εν αντιθέσει με τη βιβλιογραφία που υπάρχει για την ανθρώπινη υγεία και τον μεταβολισμό των μικροφυκών (Udayan A. et al., 2017).

Ένας ακόμα πιθανός κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μικροφύκη είναι η ύπαρξη και η συσσώρευση βαρέων μετάλλων, με χαρακτηριστικό το

αρσενικό (As) (García-Salgado S. et al., 2012). Υψηλή συσσώρευση As στα κύτταρα μικροφυκών είναι ικανή να προκαλέσει τοξικότητα στα τρόφιμα και σε προϊόντα που προέρχονται από τα μικροφύκη και αποτελεί σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Τα φύκη μετατρέπουν το αρσενικό (As) σε σάκχαρα αρσενικού και σε φωσφολιπίδια με αρσενικό όταν υπάρχει ανεπάρκεια φωσφορικών (García-Salgado S. et al., 2012). Τα υπόγεια ύδατα και τα λιπάσματα είναι τα δύο μονοπάτια μέσω των οποίων το As συσσωρεύεται στα βρώσιμα μικροφύκη πχ. της *Spirulina platensis* (Wang ZZ et. Al., 2012). Η τοξικότητα του βρωμίου (Br) είναι επίσης ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την πρόσληψη τροφών που προέρχονται από μικροφύκη χωρίς όμως οι τοξικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία να αναγνωρίζονται επαρκώς (Boyer EW et al., 2002).

Λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τις αλλεργικές αντιδράσεις των φυκών και των συναφών λειτουργικών προϊόντων διατροφής (Kawai T. et al., 2002). Ορισμένα στελέχη της *Spirulina platensis* και άλλα μπλε-πράσινα μικροφύκη παράγουν τοξίνες που προκαλούν τοξικότητα στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη που παράγεται από βρώσιμα μικροφύκη *Chlorella protothecoides* από την εταιρεία Solazyme, Inc. αποδείχθηκε ότι προκαλεί αλλεργίες σε ζωικά μοντέλα (Szabo NJ et al., 2013). Το καϊνικό οξύ, ένας τύπος αμινοξέως το οποίο είναι δομικά παρόμοιο με το γλουταμινικό οξύ, δρα ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις όμως είναι νευροτοξικό και χρησιμοποιείται συχνά για την κατασκευή μοντέλων ασθενειών σε πειραματόζωα (Wells ML et al., 2017). Όσον αφορά την κατανάλωση καϊνικού οξέος, τα πρότυπα ασφαλείας δεν είναι διαθέσιμα για τον άνθρωπο (Mouritsen OG et al., 2013). Ορισμένα συμπληρώματα διατροφής με βάση τα μπλε-πράσινα μικροφύκη μπορεί να οδηγήσουν σε ναυτία, διάρροια, εμετούς και γαστρεντερολογικά προβλήματα ενώ σε μερικά έχουν βρεθεί κυανοτοξίνες. Προβλήματα υγείας που ενδέχεται να προκληθούν από την κατανάλωση μπλε-πράσινων μικροφυκών παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην Εικόνα 6.2.1..



**Εικόνα 6.2.1.:** Προβλήματα υγείας που συνδέονται με την κατανάλωση κυανοβακτηρίων και των τοξινών τους (Udayan A. et al.,2021)

Μια επιπλέον ανησυχία για την ασφάλεια της κατανάλωσης μικροφυκών που σχετίζεται με τις εφαρμογές των μικροφυκών στα τρόφιμα είναι η υψηλή συγκέντρωση νουκλεϊνικού οξέος στη βιομάζα του, η οποία έχει συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και αυξημένο ουρικό οξύ (υπεύθυνο για ουρική αρθρίτιδα και πέτρες στα νεφρά) στους καταναλωτές (Nethravathy M.U et al., 2019).

### 6.3 Στρατηγικές βιωσιμότητας

Ορισμένες πρόσφατες μελέτες εξέτασαν την εμπορική επιτυχία των μικροφυκών στη βιομηχανία των τροφίμων και των ζωοτροφών (Bhowmick G., 2019). Ένας ενδιαφέρων τρόπος για να εξισορροπηθεί

το υψηλό κόστος παραγωγής της βιομάζας των μικροφυκών για ζωοτροφές είναι αρχικά η αξιοποίηση των λιπιδίων που υπάρχουν στα μικροφύκη για την παραγωγή βιοντίζελ, λόγω της εγγενώς υψηλής περιεκτικότητάς τους, και στη συνέχεια χρήση των υπόλοιπων συστατικών των μικροφυκών για την παραγωγή ζωοτροφών πλούσιων σε πρωτεΐνες (Gatrell S. et al., 2014). Η δυνατότητα αυτή μπορεί να επεκταθεί στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η βιομάζα λαμβάνεται από τα λύματα ως μέσο ανάπτυξης, εφόσον η τελική βιομάζα είναι απαλλαγμένη από παθογόνους μικροοργανισμούς, τοξίνες και επιβλαβή κατάλοιπα κάθε είδους και είναι ασφαλές για χρήση στις ζωοτροφές. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι η *Chlorella vulgaris* μπορεί αποτελεσματικά να καλλιεργείται σε ανεπεξέργαστα λύματα από τη βιομηχανία μεταποίησης ιχθύων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχικά για την παραγωγή βιοντίζελ, πριν καταλήξουν ως ζωοτροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες (Trivedi T. et al., 2019). Τα στελέχη *Botryococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus* εμφανίζονται ως τα πιο ελπιδοφόρα σε αυτή την προσπάθεια (Ferreira G.F et al., 2019), ενώ η εκχύλισή τους πρέπει να γίνεται, όσο το δυνατόν περισσότερο, με πράσινους διαλύτες. Η αύξηση της καλλιέργειας των μικροφυκών στα λύματα δεν παρεμποδίζει την παραγωγικότητα της βιομάζας τους (Fernández A.F.G et al., 2018) και παρακάμπτει την ανάγκη για έναν ενδιάμεσο στάδιο φυσικής εκχύλισης ή συγκέντρωσης των εν λόγω θρεπτικών ουσιών με τη μεσολάβηση φυτών πριν από την ενσωμάτωση της βιομάζας μικροφυκών στην τελική ζωοτροφή. Οι εναλλακτικές χρήσεις που εξετάζονται περιλαμβάνουν τη ζύμωση της περίσσειας βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης ή βιομεθανίου. Πιο συγκεκριμένα, οι διεργασίες που βασίζονται σε μικροφύκη μπορούν να μειώσουν την κατανάλωση ενέργειας σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων κατά το ήμισυ περίπου, επιτρέποντας παράλληλα την ανάκτηση έως και του 90% των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν σε αυτά. Όταν η παραγωγή μικροφυκών συνδυάζεται με ανάκτηση θρεπτικών ουσιών από λύματα, το σχετικό κόστος παραγωγής βρίσκεται κάτω από 1 €/kg, ένα όριο που συνήθως είναι αποδεκτό για οικονομική βιωσιμότητα (Camacho F. et al., 2019). Ωστόσο, υπάρχει ακόμη περιθώριο βελτίωσης της τεχνολογίας όσον αφορά τις διαδικασίες παραγωγής και συγκομιδής, που βασίζονται σε φωτοβιοαντιδραστήρες, σε προσπάθειες μείωσης των απαιτήσεων γης και του χρόνου υδραυλικής κατακράτησης των λυμάτων (Fernández A.F.G et al., 2018).

Η εν λόγω τεχνολογία πρέπει επίσης να προσαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα πηγών λυμάτων, από οικιακά λύματα έως κοπριά βοοειδών. Οι τιμές-στόχοι δείχνουν την ανάγκη 450 τόνων άνθρακα C, 25 τόνων αζώτου N και 2,5 τόνων φωσφόρου P ανά εκτάριο και ανά έτος για την υποστήριξη της παραγωγής βιομάζας των 200 τόνων / εκτάριο, ενώ τα τρέχοντα επίπεδα εξακολουθούν να είναι πολύ χαμηλότερα και οι βελτιώσεις πιθανότατα θα χρειαστούν υψηλότερη αποδοτικότητα της χρήσης του φωτός. Ταυτόχρονα, η απομόνωση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> για να χρησιμεύσει ως πηγή άνθρακα C αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό πλεονέκτημα των φωτοτροφικών μικροφυκών, το οποίο θα ενισχύσει το ανταγωνιστικό τους πλεονέκτημα καθώς η περιβαλλοντική νομοθεσία γίνεται όλο και

πιο αυστηρή. Άλλο πλεονέκτημα της χρήσης των λυμάτων, ως πρώτη ύλη, προέρχεται από την υψηλή κατανάλωση νερού που απαιτείται για την καλλιέργεια μικροφυκών εκτός από τις ενεργειακές απαιτήσεις και τις απαιτήσεις για μορφές αζώτου (Ferreira G.F et al., 2019). Η σύζευξη της παραγωγής βιομάζας με την ανάκτηση θρεπτικών ουσιών από τα απόβλητα θα αποτελέσει μονόδρομος τα επόμενα χρόνια, σε μια συνεχή αναζήτηση οικονομικής βιωσιμότητας και περαιτέρω αναζήτησης καλύτερων στελεχών για την επίτευξη του σκοπού αυτού (Ferreira G.F et al., 2019).

#### 6.4 Αναδυόμενες τάσεις και μελλοντικές ευκαιρίες έρευνας

Με την προβλεπόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και την κλιματική αλλαγή, ο άνθρωπος είναι αντιμέτωπος με μια άνευ προηγουμένου πίεση για βιώσιμους πόρους τροφίμων ικανούς να παρέχουν οφέλη για την υγεία εκτός από τη βασική διατροφή. Από αυτή την άποψη, τα μικροφύκη είναι φυσικοί πόροι που μπορεί να συμβάλουν στην κάλυψη αυτού του χάσματος τόσο από άποψη βιωσιμότητας, όσο και της δυνατότητας διατροφής με φθηνότερο κόστος. Καθώς το πεδίο εμπορευματοποίησης των μικροφυκών είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο, υπάρχουν ακόμη πολλά περιθώρια βελτίωσης σχετικά με την αύξηση της χρηματοδότησης για έρευνα, την ανάπτυξη στον κλάδο των βιοκαυσίμων αλλά και στην χρήση των μικροφυκών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων για την καλλιέργεια των μικροφυκών (Mennella L. et al., 2020). Οι διεργασίες που βασίζονται σε μικροφύκη αναπτύσσονται γενικά για μια συγκεκριμένη εφαρμογή. Αυτή τη στιγμή δεν υπάρχει αγορά για την εναπομείνασα βιομάζα μετά την εξαγωγή του βιολογικού προϊόντος για την οποία προορίζεται μια καλλιέργεια μικροφυκών, και αυτό μπορεί επίσης να αποτελέσει ευκαιρία ανάπτυξης μια βιομηχανίας που θα βασίζεται στα απόβλητα των καλλιεργειών μικροφυκών και της επεξεργασίας τους (Mennella L. et al., 2020).

Μέχρι σήμερα, τα μικροφύκη και τα παράγωγά τους έχουν ενσωματωθεί αποκλειστικά σε πολύ μικρές ποσότητες σε τρόφιμα. Έτσι, για την καλύτερη αποδοχή τους στον δυτικό τρόπο ζωής, απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με τα οφέλη των μικροφυκών στην ανθρώπινη υγεία. Έτσι, ένας νέος κλάδος των τροφίμων είναι η ανάπτυξη σνακ και τροφίμων με ενσωματωμένα μικροφύκη που σε συνδυασμό με τα παραδοσιακά ασιατικά και ινδικά μπαχαρικά θα αυξήσει την πιθανότητα των δυτικών καταναλωτών να αποδεχθούν αυτές τις νέες γεύσεις και κατ'επέκταση τα νέα προϊόντα (Chacon-Lee T. L. & Gonzalez-Marin G. E., 2010). Ένας άλλος τομέας έρευνας για να ξεπεραστεί η έντονη γεύση των μικροφυκών θα μπορούσε να είναι η εύρεση νέων στελεχών για την αντικατάσταση των αυτοτροφικών με ετερότροφα μικροφύκη, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν ουδέτερο χρώμα και γεύση, οδηγώντας σε μεγαλύτερη αποδοχή από τον καταναλωτή (Klamczynska B. & Mooney W. D., 2017).

Επιπλέον τομέας που τα μικροφύκη διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων είναι αυτός της χρήσης τους ως πηκτικά μέσα, λόγω των σημαντικών ποσοτήτων δομικών πολυμερών που παράγουν, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, υδατανθράκων και πολυσακχαριτών που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως τροποποιητές της υφής, σταθεροποιητές ή γαλακτωματοποιητές. Αυτές οι εφαρμογές παραμένουν ανεκμετάλλευτες λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας των μικροφυκών που προκύπτουν από έντονες εξελικτικές διαδικασίες και την υψηλή εξάρτησή τους από τις συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. ένταση φωτός, θερμοκρασία, διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών) (Bernaerts T. M. M. et al., 2019). Μέχρι σήμερα, υπάρχουν περιορισμένες μελέτες σχετικά με τις ρεολογικές ιδιότητες των πολυμερών των μικροφυκών. Για τις πρωτεΐνες των μικροφυκών, μελέτες δείχνουν ότι μπορούν να εκφράζουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις ιδιότητες των τροφίμων, όπως ο αφρισμός και η γαλακτωματοποίηση, καθώς και με υδροδυναμικές ιδιότητες (π.χ. πηκτωματοποίηση), και είναι συγκρίσιμα με τα συστατικά του εμπορίου (Garcia E. et al., 2018).

Τα μικροφύκη παράγουν πολυσακχαρίτες που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν βιοφίλμ. Τα σχηματιζόμενα βιοφίλμ μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον τομέα της συσκευασίας καθώς μπορούν να μεταφερθούν οι ιδιότητες των μικροφυκών (π.χ. χρωστικές, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακές ιδιότητες, φαρμακοτρόφιμα) μέσω των βρώσιμων μεμβρανών για την ενίσχυση των τροφίμων. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον και έρευνες έχουν κατευθυνθεί στη χρήση βρώσιμων υλικών για την αντικατάσταση των πλαστικών συσκευασιών στα τρόφιμα. Οι βρώσιμες μεμβράνες είναι φυσικές και βιοδιασπώμενες ενώσεις που δρουν ως ημιπερατό φράγμα στα αέρια και τους υδρατμούς, μειώνουν τις ποιοτικές απώλειες και βελτιώνουν τη διάρκεια ζωής των τροφών (de Jesus Raposo M. F. et al., 2015). Έχει ήδη πραγματοποιηθεί η εφαρμογή βιοδιασπώμενων επικαλύψεων με βάση μικροφύκη (*Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* και *Spirulina platensis*) σε εξωτικά φρούτα, όπως η παπάγια, το μάνγκο, η μπανάνα, η γκουάβα και οι πιπεριές, παρέχοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Σε όλες τις μελέτες, η εφαρμογή βιοδιασπώμενων υλικών με βάση τα μικροφύκη στις μεμβράνες των τροφίμων είχαν θετική επίδραση στη μετασυλλεκτική ποιότητα των καρπών με καθυστέρηση της διαδικασίας ωρίμανσης και με χαμηλότερες απώλειες μάζας και αυξημένη φρεσκάδα (Cardoso T. et al., 2017).

Για να αποφευχθούν οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στα τρόφιμα, μια πιθανή εναλλακτική λύση είναι η εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων που προέρχονται από μικροφύκη και η ενσωμάτωσή τους στα τρόφιμα αντί ολόκληρης της βιομάζας, μέσω της τεχνολογίας της μικροενθυλάκωσης (Lafarga T., 2019). Η μικροενθυλάκωση περιλαμβάνει την προστασία των βασικών βιοδραστικών ενώσεων σε μια μήτρα ενθυλάκωσης που λειτουργεί ως λειτουργικό φράγμα προς αποφυγή χημικών και φυσικών αντιδράσεων και τη διατήρηση των βιολογικών, λειτουργικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βασικών υλικών. Αποτελεί μια τεχνική που έχει κατακόρυφη αύξηση της χρήσης της

τόσο στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων όσο και των τροφοφαρμάκων (Bakry A. M. et al., 2016). Τα έλαια φυκιών που περιέχουν DHA/EPA είναι γενικά κατάλληλα για ενσωμάτωση σε τρόφιμα, αλλά η χρήση τους περιορίζεται από τον σχηματισμό ανεπιθύμητης γεύσης και οσμής, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Είναι χημικά ασταθή και ευαίσθητα στην οξείδωση και την απώλεια πτητικών ενώσεων και έτσι επηρεάζουν τη συνολική ποιότητα του προϊόντος, (Velasco J. et al., 2003). Έχουν γίνει ήδη μελέτες σχετικά με την εφαρμογή της μικροενθυλάκωσης σε έλαια μικροφυκών (Bao S-S et al., 2011). Εκτός από το έλαιο μικροφυκών, η μικροενθυλάκωση μπορεί επίσης να βοηθήσει στη σταθεροποίηση των καροτενοειδών για ενσωμάτωση στα τρόφιμα (Machado F. R. S. et al., 2014).

Μια ακόμα τεχνολογία που θα έχει εφαρμογή στο άμεσο μέλλον είναι η 3D εκτύπωση των τροφίμων. Η ευελιξία της 3D εκτύπωσης επιτρέπει την ενσωμάτωση ενός ευρέος φάσματος συστατικών στην επεξεργασία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων και των μικροφυκών (An Y. J. et al., 2019). Μελέτες πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας μικροφύκη ως συστατικά για την παραγωγή 3D εκτυπωμένων υγιεινών σνακ και βρώσιμων συσκευασιών. Καθώς η ατζέντα της βιωσιμότητας αναπτύσσεται στη βιομηχανία τροφίμων, αναζητούνται μέθοδοι αντικατάστασης του κρέατος με ένα αντίστοιχο φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων και των μικροφυκών και την τεχνολογία 3D εκτύπωσης, επομένως αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τάση στον τομέα των τροφίμων (Ferreira A. et al., 2021).

Ένα άλλο πεδίο ενδιαφέροντος, αρκετά υποσχόμενο, είναι η παραγωγή φυσικών χρωστικών ουσιών για καλλυντικά (π.χ. κραγιόν, σκιές ματιών, μολύβια ματιών κ.λπ.) καθώς ορισμένα μικροφύκη και κυανοβακτήρια είναι πλούσια σε χρωστικές ουσίες, όπως οι φυκοκυανίνες. Ωστόσο απαιτούνται νέες έρευνες για την απομόνωση και την επιλογή στελεχών μικροφυκών/κυανοβακτηρίων με βάση τα επιθυμητά προϊόντα, τα οποία μπορούν να ανεχθούν το θερμοκρασιακό στρες και αναπτύσσονται εύκολα στο μέσο καλλιέργειας. Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας μπορεί να βελτιώσει την παραγωγικότητα του επιθυμητού προϊόντος (Mourelle M. L et al., 2017).

Η παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω των μικροφυκών και της βιομάζας τους μπορεί να γίνει οικονομική συμπληρώνοντάς την με ένα στρατηγικό πλάνο για την συμπαραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα λιπίδια μπορούν δυνητικά να μετατραπούν σε βιοκαύσιμα, ενώ η βιομάζα μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολύτιμων οργανικών ουσιών όπως υδαάνθρακες, χρωστικές ουσίες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες, τα οποία έχουν μεγάλη ζήτηση ως πρόσθετα προϊόντων σε πολλούς κλάδους (Lammens T. et al., 2012). Μελλοντική ανάπτυξη των τεχνολογιών παραγωγής και οι συνθήκες αγοράς των βιοκαυσίμων που προέρχονται από αυτά μπορεί να καταστήσει οικονομικά εφικτή την παραγωγή τους (Stephens E. et al., 2010).



Τα βιολιπάσματα είναι οι ουσίες που διευκολύνουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και την πρόσληψή τους από τα φυτά. Δεν προωθούν μόνο την ανάπτυξη των φυτών, αλλά και αποτρέπουν την είσοδο και την εισβολή σε παθογόνα και παράσιτα, καθώς βοηθούν στην αποσύνθεση των οργανικών υπολειμμάτων. Οι μεταβολίτες μικροφυκών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιολιπασμάτων/βιοδιεγερτών, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των ανώτερων φυτών (Lu Y. & Xu J., 2015). Τα χημικά λιπάσματα που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στη ρύπανση του εδάφους και των υδάτων. Ο στόχος της μείωσης της ρύπανσης συνδυαστικά με την εκπλήρωση του στόχου της παγκόσμιας ζήτησης τροφίμων έχει οδηγήσει σε τεράστιο ενδιαφέρον υπέρ των βιοδιεγερτών και των βιολιπασμάτων ως μια καθαρότερη και βιώσιμη εναλλακτική λύση στη γεωργία καθώς είναι ασφαλέστερες και καθαρότερες εναλλακτικές λύσεις ως βιοδιασπώμενες και μη τοξικές. Η βιοδιεγερτική δράση οφείλεται σε φυτοορμόνες, όπως ινδολοοξικό οξύ, γιββερελλικό οξύ, κυτοκινίνες και άλλα που συντίθενται από μικροφύκη όπως *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* κ.λπ. (Lu Y & Xu J., 2015). Τα κυανοβακτήρια προάγουν χαρακτηριστικά του εδάφους όσον αφορά την οργανική περιεκτικότητα, τον εμπλουτισμό με άζωτο, την υγρασία του εδάφους και βοηθά στη συσσωμάτωση σωματιδίων εδάφους, φωσφορικών αλάτων κλπ (Lu Y. & Xu J., 2015).

## Γενικά συμπεράσματα

Η συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού σε συνδυασμό με την αυξημένη ζήτηση για τροφή έχουν οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα αλλά τους καταναλωτές στην αναζήτηση νέων προϊόντων, φιλικά προς το περιβάλλον, που θα παρασκευάζονται από φυσικά συστατικά. Επομένως, η εύρεση εναλλακτικών λύσεων βρίσκεται σε πρώτο πλάνο και τα μικροφύκη σε συνδυασμό με τα παράγωγά τους αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη επιλογή. Η αξιοσημείωτη δυνατότητα των μικροφυκών να φωτοσυνθέτουν και να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα σε συνάρτηση με την τεράστια βιοποικιλότητά τους και της ικανότητά τους να βιοσυνθέτουν πλήθος βιοδραστικών ενώσεων, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ενώσεις έχουν ως αποτέλεσμα τα μικροφύκη να αποτελούν ένα ελκυστικό σημείο προσοχής για τον επιστημονικό κόσμο και τις βιομηχανίες.

Σήμερα, διάφορες βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούν βιοδραστικές ενώσεις που απομονώνονται από μικροφύκη και τις ενσωματώνουν με επιτυχία στα προϊόντα που εμπορεύονται. Ωστόσο, παρά την τρέχουσα χρήση των μικροφυκών στη βιομηχανία, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη πηγή και πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες την τελευταία δεκαετία που στοχεύουν στην αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των μικροφυκών και των μηχανισμών δράσης τους (όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική κλπ δράση) καθώς και στον εντοπισμό πιθανών παραγωγών για μελλοντικές βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η τεχνολογία της καλλιέργειας και της επεξεργασίας μικροφυκών βρίσκεται ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο και υπάρχουν προκλήσεις, όπως το υψηλό κόστος παραγωγής, οι κίνδυνοι μόλυνσης της καλλιέργειας, η επιλογή και η χρήση κατάλληλων συστημάτων παρακαλούθησης και ελέγχου, η απομόνωση ενώσεων με υψηλή απόδοση, τα νομοθετικά και ρυθμιστικά ζητήματα που οφείλουν να αντιμετωπιστούν. Το πεδίο εμπορευματοποίησης των μικροφυκών είναι σε πρωταρχικό επίπεδο και υπάρχουν ακόμα πολλά περιθώρια βελτίωσης σχετικά με την αύξηση χρηματοδότησης για έρευνα και ανάπτυξη, ώστε να αντιμετωπιστούν οι σημερινοί περιορισμοί και να δημιουργηθούν προϊόντα εμπορικά βιώσιμα με ευρεία αποδοχή από τον παγκόσμιο πληθυσμό.

## Βιβλιογραφία

Aarthy, A., Kumari, S., Turkar, P., Subramanian, S., 2018. An insight on algal cell disruption for biodiesel production. *Asian J Pharm Clin Res* 11, 21–26.

Abd El-Hack, M.E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M.A., Khafaga, A.F., Mahgoub, S.A., Elnesr, S.S., Gebriel, M.G., 2019. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & pharmacotherapy* 111, 42–50.

Acién Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Fernández-Sevilla, J.M., 2018. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2, 59.

Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F., 2012. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. *Bioresource technology* 114, 457–465.

Adarme-Vega, T.C., Lim, D.K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., Schenk, P.M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories* 11, 1–10.

Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M., 2014. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current opinion in biotechnology* 26, 14–18.

Agregán, R., Munekata, P.E., Franco, D., Carballo, J., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., 2018. Antioxidant potential of extracts obtained from macro-(*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and micro-algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound. *Medicines* 5, 33.

Ahmadi, A., Zorofchian Moghadamtousi, S., Abubakar, S., Zandi, K., 2015. Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: a review. *BioMed research international* 2015.

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R., 2011. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology* 31, 227–249.

Alangaden, G.J., 2011. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics* 25, 201–225.

Al-Mola, H.F., 2009. Antibacterial activity of crude extracts and phlorotannin isolated from the diatom *Cymbella* spp. *J. Pharm. Res* 2, 304–308.

- Amin, S., 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy conversion and management* 50, 1834–1840.
- Amorim, M.L., Soares, J., Coimbra, J.S. dos R., Leite, M. de O., Albino, L.F.T., Martins, M.A., 2021. Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61, 1976–2002.
- Ampofo, J., Abbey, Lord, 2022. Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. *Foods* 11, 1744.
- An, Y.-J., Guo, C.-F., Zhang, M., Zhong, Z.-P., 2019. Investigation on characteristics of 3D printing using *Nostoc sphaeroides* biomass. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 639–646.
- Arad, S.M., Yaron, A., 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology* 3, 92–97.
- Arafah, A., Abassy, M., Morcos, S., Hussein, L., 1981. Nutritive quality of baladi bread supplemented with fish protein concentrate, green algae, or synthetic amino acids.
- Armenta, R.E., Valentine, M.C., 2013. Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90, 167–182.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., Liang, L., 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 15, 143–182.
- Bao, S.-S., Hu, X.-C., Zhang, K., Xu, X.-K., Zhang, H.-M., Huang, H., 2011. Characterization of spray-dried microalgal oil encapsulated in cross-linked sodium caseinate matrix induced by microbial transglutaminase. *Journal of food science* 76, E112–E118.
- Barkia, I., Saari, N., Manning, S.R., 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs* 17, 304.
- Baumgardt, F.J., Zandoná Filho, A., Brandalize, M.V., da Costa, D.C., Antoniosi Filho, N.R., Abreu, P.C., Corazza, M.L., Ramos, L.P., 2016. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids* 108, 89–95.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances* 25, 207–210.
- Begum, H., Yusoff, F.M., Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M., 2016. Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical reviews in food science and nutrition* 56, 2209–2222.

- Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., Khosravi-Darani, K., 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12, 144–154.
- Bengtson, D.A., 2003. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. *Live feeds in marine aquaculture* 1–16.
- Bensalem, S., Lopes, F., Bodénès, P., Pareau, D., Français, O., Le Pioufle, B., 2018. Understanding the mechanisms of lipid extraction from microalga *Chlamydomonas reinhardtii* after electrical field solicitations and mechanical stress within a microfluidic device. *Bioresource technology* 257, 129–136.
- Bermejo, R., Ación, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E., Alvarez-Pez, J.M., 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of chromatography B* 790, 317–325.
- Bernaerts, T.M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.M., 2019. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology advances* 37, 107419.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P., Bell, I.J.S., 2011. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1, S1–S7.
- Bhalamurugan, G.L., Valerie, O., Mark, L., 2018. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research* 23, 229–241.
- Bleakley, S., Hayes, M., 2017. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods* 6, 33.
- Bloch, J.-F., Tardieu-Guigues, E., 2014. Marine biotechnologies and synthetic biology, new issues for a fair and equitable profit-sharing commercial use. *Marine genomics* 17, 79–83.
- Borjas Esqueda, A., Gardarin, C., Laroche, C., 2022. Exploring the diversity of red microalgae for exopolysaccharide production. *Marine drugs* 20, 246.
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of applied phycology* 25, 743–756.
- Boyer, E.W., Kearney, S., Shannon, M.W., Quang, L., Woolf, A., Kemper, K., 2002. Poisoning from a dietary supplement administered during hospitalization. *Pediatrics* 109, E49.

- Bratchkova, A., Kroumov, A.D., 2020. Microalgae as producers of biologically active compounds with antibacterial, antiviral, antifungal, antialgal, antiprotozoal, antiparasitic and anticancer activity. *Acta Microbiol Bulg* 36, 79–89.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews* 14, 557–577.
- Camacho, F., Macedo, A., Malcata, F., 2019. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. *Marine drugs* 17, 312.
- Caporgno, M.P., Mathys, A., 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in nutrition* 5, 58.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A., 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 155–171.
- Cardoso, L.C., Serrano, C.M., Rodríguez, M.R., de la Ossa, E.J.M., Lubián, L.M., 2012. Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology.
- Cardoso, T., Demiate, I.M., Danesi, E.D.G., 2017. Research Article Biodegradable Films with *Spirulina platensis* as Coating for Cambuci Peppers (*Capsicum* sp.). *Am. J. Food Technol* 12, 236–244.
- Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 60–78.
- Carlsson, A.S., Van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D., 2007. Micro-and macro-algae: utility for industrial applications. *Outputs from the EPOBIO project* 82.
- Carrasco-Pancorbo, A., Neusüß, C., Pelzing, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2007. CE-and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis* 28, 806–821.
- Carvalho, A.P., Monteiro, C.M., Malcata, F.X., 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J Appl Phycol* 21, 543–552. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9415-z>
- Castenholz, R.W., Waterbury, J.B., 1989. Taxa of the cyanobacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 3, 1727–1728.

- Cezare-Gomes, E.A., Mejia-da-Silva, L. del C., Pérez-Mora, L.S., Matsudo, M.C., Ferreira-Camargo, L.S., Singh, A.K., de Carvalho, J.C.M., 2019. Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied biochemistry and biotechnology* 188, 602–634.
- Cha, K.H., Koo, S.Y., Lee, D.-U., 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 10521–10526.
- Chacón-Lee, T.L., González-Mariño, G.E., 2010. Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 9, 655–675.
- Chakraborty, R.D., Chakraborty, K., Radhakrishnan, E.V., 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker’s yeast for use in larviculture. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 4043–4051.
- Charles, C.N., Msagati, T., Swai, H., Chacha, M., 2019. Microalgae: An alternative natural source of bioavailable omega-3 DHA for promotion of mental health in East Africa. *Scientific African* 6, e00187.
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* 78, 1–10.
- Chen, G., Qu, S., Wang, Q., Bian, F., Peng, Z., Zhang, Y., Ge, H., Yu, J., Xuan, N., Bi, Y., 2014. Transgenic expression of delta-6 and delta-15 fatty acid desaturases enhances omega-3 polyunsaturated fatty acid accumulation in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for biofuels* 7, 1–10.
- Cheng, X., Qi, Z., Burdyny, T., Kong, T., Sinton, D., 2018. Low pressure supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip. *Bioresource technology* 250, 481–485.
- Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2017. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology* 229, 53–62.
- Ching, X.L., Zainal, N.A.A.B., Luang-In, V., Ma, N.L., 2022. Lab-based meat the future food. *Environmental Advances* 10, 100315.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 25, 294–306.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S., 2017. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresource technology* 244, 1376–1383.

Christaki, E., Bonos, E., Florou-Paneri, P., 2015. Innovative microalgae pigments as functional ingredients in nutrition, in: Handbook of Marine Microalgae. Elsevier, pp. 233–243.

Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E., 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. International journal of food sciences and nutrition 62, 794–799.

Commission Regulation (EU) No 1274/2013 - EUR-Lex, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:328:0079:0085:EN:PDF> [Accessed 4 November 2023]

Commission Implementing Regulation (EU) 2023/1581 – EUR-Lex, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R1581> [Accessed 4 November 2023]

Conde, T.A., Neves, B.F., Couto, D., Melo, T., Neves, B., Costa, M., Silva, J., Domingues, P., Domingues, M.R., 2021. Microalgae as sustainable bio-factories of healthy lipids: Evaluating fatty acid content and antioxidant activity. Marine drugs 19, 357.

Cooney, M., Young, G., Nagle, N., 2009. Extraction of bio-oils from microalgae. Separation & Purification Reviews 38, 291–325.

Costa, J.A.V., Freitas, B.C.B., Rosa, G.M., Moraes, L., Morais, M.G., Mitchell, B.G., 2019. Operational and economic aspects of Spirulina-based biorefinery. Bioresource technology 292, 121946.

Costa, J.A.V., Lucas, B.F., Alvarenga, A.G.P., Moreira, J.B., de Morais, M.G., 2021. Microalgae polysaccharides: an overview of production, characterization, and potential applications. Polysaccharides 2, 759–772.

Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The future of peptide-based drugs. Chemical biology & drug design 81, 136–147.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrasonics sonochemistry 15, 898–902.

Cui, Y., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M., 2019. Phaeodactylum tricornutum microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. Food chemistry 297, 124937.

Cussatlegras, A.-S., Le Gal, P., 2004. Bioluminescence of the dinoflagellate Pyrocystis noctiluca induced by laminar and turbulent Couette flow. Journal of experimental marine biology and ecology 310, 227–246.



- da Silva Ferreira, V., Sant'Anna, C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 20.
- da Silva Vaz, B., Moreira, J.B., de Moraes, M.G., Costa, J.A.V., 2016. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current opinion in food science* 7, 73–77.
- Dahmen-Ben Moussa, I., Belhaj, D., Ayadi, H., 2022. Optimization of extraction process of polyphenols from wild halotolerant cyanobacteria, *Phormidium versicolor* (NCC 466). *Biomass Conversion and Biorefinery* 1–11.
- Danesh, A.F., Ebrahimi, S., Salehi, A., Parsa, A., 2017. Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal* 125, 56–64.
- Dantas, D.M. de M., Oliveira, C.Y.B. de, Costa, R.M.P.B., Carneiro-da-Cunha, M. das G., Gálvez, A.O., Bezerra, R. de S., 2019. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. *Food Science and Technology International* 25, 318–326.
- De Bhowmick, G., Sarmah, A.K., Sen, R., 2019. Performance evaluation of an outdoor algal biorefinery for sustainable production of biomass, lipid and lutein valorizing flue-gas carbon dioxide and wastewater cocktail. *Bioresource technology* 283, 198–206.
- de Jesus Raposo, M.F., De Moraes, A., De Moraes, R., 2014. Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae, *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology*. Springer: Cham, Switzerland.
- de Jesus Raposo, M.F., De Moraes, A.M.B., De Moraes, R.M.S.C., 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine drugs* 13, 2967–3028.
- de Jesus Raposo, M.F., De Moraes, A.M.M.B., De Moraes, R.M.S.C., 2016. Emergent sources of prebiotics: Seaweeds and microalgae. *Marine drugs* 14, 27.
- de Moraes, M.G., de Moraes, E.G., Silva Vaz, B. da, Goncalves, C.F., Lisboa, C., Vieira Costa, J.A., 2016. Nanoencapsulation of the bioactive compounds of *Spirulina* with a microalgal biopolymer coating. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16, 81–91.
- Del Mondo, A., Smerilli, A., Ambrosino, L., Albini, A., Noonan, D.M., Sansone, C., Brunet, C., 2021a. Insights into phenolic compounds from microalgae: Structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Critical Reviews in Biotechnology* 41, 155–171.

- Del Mondo, A., Smerilli, A., Ambrosino, L., Albini, A., Noonan, D.M., Sansone, C., Brunet, C., 2021b. Insights into phenolic compounds from microalgae: Structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Critical Reviews in Biotechnology* 41, 155–171.
- Deniz, I., García-Vaquero, M., Imamoglu, E., 2017. Trends in red biotechnology: Microalgae for pharmaceutical applications, in: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier, pp. 429–460.
- Di Stefano, E., Agyei, D., Njoku, E.N., Udenigwe, C.C., 2018. Plant RuBisCo: An underutilized protein for food applications. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95, 1063–1074.
- Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., Das, D., 2019. Microalgae—nutritious, sustainable aqua-and animal feed source. *Journal of Functional Foods* 62, 103545.
- Doughman, S.D., Krupanidhi, S., Sanjeevi, C.B., 2007. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current diabetes reviews* 3, 198–203.
- Eilertsen, H.C., Huseby, S., Degerlund, M., Eriksen, G.K., Ingebrigtsen, R.A., Hansen, E., 2014. The effect of freeze/thaw cycles on reproducibility of metabolic profiling of marine microalgal extracts using direct infusion high-resolution mass spectrometry (HR-MS). *Molecules* 19, 16373–16380.
- Eliás, J.L., Voltolina, D., Ortega, C.C., Rodríguez, B.R., Gaxiola, L.S., Esquivel, B.C., Nieves, M., 2003. Mass production of microalgae in six commercial shrimp hatcheries of the Mexican northwest. *Aquacultural engineering* 29, 155–164.
- Encarnaçãõ, T., Burrows, H.D., Pais, A.C., Campos, M.G., Kremer, A., 2012. Effect of N and P on the Uptake of Magnesium and Iron and on the Production of Carotenoids and Chlorophyll by the Microalgae *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science and Technology. A* 2, 824.
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., Sijtsma, L., 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *Institute for Prospective Technological Studies* fashion nutraceuticals 1017–1024.
- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology* 80, 1–14.
- Eroglu, A., Harrison, E.H., 2013. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *Journal of lipid research* 54, 1719–1730.

- Esquivel-Hernández, D.A., López, V.H., Rodríguez-Rodríguez, J., Alemán-Nava, G.S., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Rostro-Alanis, M., Parra-Saldívar, R., 2016. Supercritical carbon dioxide and microwave-assisted extraction of functional lipophilic compounds from *Arthrospira platensis*. *International journal of molecular sciences* 17, 658.
- Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine drugs* 14, 159.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2013. *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.
- Fang, N., Wang, C., Liu, Xiaofeng, Zhao, X., Liu, Y., Liu, Xinmin, Du, Y., Zhang, Z., Zhang, H., 2019. De novo synthesis of astaxanthin: From organisms to genes. *Trends in food science & technology* 92, 162–171.
- FAO, I., UNICEF, W., WFP, W., 2019. *Food security and nutrition in the world*. IEEE journal of selected topics in applied earth observations and remote sensing. Rome: FAO 320.
- Fassett, R.G., Coombes, J.S., 2011. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine drugs* 9, 447–465.
- Ferreira, A., Guerra, I., Costa, M., Silva, J., Gouveia, L., 2021. Future perspectives of microalgae in the food industry, in: *Cultured Microalgae for the Food Industry*. Elsevier, pp. 387–433.
- Ferreira, G.F., Pinto, L.R., Maciel Filho, R., Fregolente, L.V., 2019. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 109, 448–466.
- Ferruzzi, M.G., Böhm, V., Courtney, P.D., Schwartz, S.J., 2002. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of food Science* 67, 2589–2595.
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A., 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1656–1664.
- Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., 2013. Bioactive phenolic compounds from algae. *Bioactive compounds from marine foods: plant and animal sources* 113–129.
- Gabr, G.A., El-Sayed, S.M., Alharthy, K.M., Seshadri, V.D., Hassan, N.M., 2022. Hepatoprotective effect of *Spirulina platensis* on liver functions of diabetic rats via TNF- $\alpha$  and IL-6 pathway.

- Garcia, E.S., Van Leeuwen, J., Safi, C., Sijtsma, L., Eppink, M.H., Wijffels, R.H., van den Berg, C., 2018. Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. *Bioresource technology* 268, 197–203.
- García, J.L., De Vicente, M., Galán, B., 2017. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial biotechnology* 10, 1017.
- García-Salgado, S., Quijano, M.A., Bonilla, M.M., 2012a. Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica chimica acta* 714, 38–46.
- García-Salgado, S., Raber, G., Raml, R., Magnes, C., Francesconi, K.A., 2012b. Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae. *Environmental Chemistry* 9, 63–66.
- García-Segovia, P., Pagán-Moreno, M.J., Lara, I.F., Martínez-Monzó, J., 2017. Effect of microalgae incorporation on physicochemical and textural properties in wheat bread formulation. *Food Science and Technology International* 23, 437–447.
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Semba Prasetya, F., Arsad, S., Jaouen, P., Babin, M., 2014. Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Marine drugs* 12, 3161–3189.
- Gatrell, S., Lum, K., Kim, J., Lei, X.G., 2014. Nonruminant Nutrition Symposium: Potential of defatted microalgae from the biofuel industry as an ingredient to replace corn and soybean meal in swine and poultry diets. *Journal of animal science* 92, 1306–1314.
- Gauthier, M.R., Senhorinho, G.N.A., Scott, J.A., 2020. Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal research* 52, 102104.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., Popović Perković, Z., 2019. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules* 9, 244.
- Gerber, P., Dutcher, J.D., Adams, E.V., Sherman, J.H., 1958. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 99, 590–593.
- Gerster, H., 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition* 16, 109–126. <https://doi.org/10.1080/07315724.1997.10718661>

- Ghasemi Naghdi, F., González González, L.M., Chan, W., Schenk, P.M., 2016. Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. *Microbial biotechnology* 9, 718–726.
- Gibbs, S.P., 1992. The evolution of algal chloroplasts, in: *Origins of Plastids: Symbiogenesis, Prochlorophytes and the Origins of Chloroplasts*. Springer, pp. 107–121.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., 2019. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in natural ecosystems and the human diet: Assumptions and challenges. *Biomolecules* 9, 485.
- Gnanamoorthy, P., Anandhan, S., Prabu, V.A., 2014. Natural nanoporous silica frustules from marine diatom as a biocarrier for drug delivery. *Journal of Porous Materials* 21, 789–796.
- Goh, B.H.H., Ong, H.C., Cheah, M.Y., Chen, W.-H., Yu, K.L., Mahlia, T.M.I., 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107, 59–74.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L., 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology* 24, 1477–1486.
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K., 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* 7, 51–57.
- Gong, M., Bassi, A., 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances* 34, 1396–1412.
- Gouda, M., Tadda, M.A., Zhao, Y., Farmanullah, F., Chu, B., Li, X., He, Y., 2022. Microalgae bioactive carbohydrates as a novel sustainable and eco-friendly source of prebiotics: emerging health functionality and recent technologies for extraction and detection. *Frontiers in Nutrition* 9, 806692.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonca, E., Batista, A.P., Sousa, I., Bandarra, N.M., Raymundo, A., 2008. Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 891–896.
- Grima, E.M., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A., 2013. Downstream processing of cell mass and products. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* 267–309.
- Grobbelaar, J.U., 2004. Algal nutrition: mineral nutrition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* 97–115.

- Guderjan, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D., 2007. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 55–62.
- Guderjan, M., Töpfl, S., Angersbach, A., Knorr, D., 2005. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of food engineering* 67, 281–287.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Barbosa, C.R., Pereira, R.D., Malcata, F.X., 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and  $\alpha$ -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44, 2721–2729.
- Gupta, A.K., Seth, K., Maheshwari, K., Baroliya, P.K., Meena, M., Kumar, A., Vinayak, V., 2021. Biosynthesis and extraction of high-value carotenoid from algae. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 26, 171–190.
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Oral, İ., Öncel, S.Ş., Elibol, M., 2020. Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds, in: *CMBEBIH 2019: Proceedings of the International Conference on Medical and Biological Engineering*, 16 -- 18 May 2019, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina. Springer, pp. 267–272.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances* 30, 709–732.
- Hannan, M.A., Sohag, A.A.M., Dash, R., Haque, M.N., Mohibullah, M., Oktaviani, D.F., Hossain, M.T., Choi, H.J., Moon, I.S., 2020. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. *Phytomedicine* 69, 153201.
- Haoujar, I., Cacciola, F., Abrini, J., Mangraviti, D., Giuffrida, D., Oulad El Majdoub, Y., Kounoun, A., Miceli, N., Fernanda Taviano, M., Mondello, L., 2019. The contribution of carotenoids, phenolic compounds, and flavonoids to the antioxidative properties of marine microalgae isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules* 24, 4037.
- Harel, M., Clayton, D., Bullis, R., 2007. Feed formulation for terrestrial and aquatic animals. Google Patents.
- Harun, I., Yahya, L., Chik, M.N., Kadir, N.N.A., Pang, M.A.M.A., 2014. Effects of natural light dilution on microalgae growth. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 5, 112.
- Harun, R., Danquah, M.K., Forde, G.M., 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85, 199–203.

- Harwood, J.L., 2019. Algae: Critical sources of very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biomolecules* 9, 708.
- Hayashi, K., Lee, J.-B., Atsumi, K., Kanazashi, M., Shibayama, T., Okamoto, K., Kawahara, T., Hayashi, T., 2019. In vitro and in vivo anti-herpes simplex virus activity of monogalactosyl diacylglyceride from *Coccomyxa* sp. KJ (IPOD FERM BP-22254), a green microalga. *PLoS One* 14, e0219305.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I., 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of natural products* 59, 83–87.
- Hehemann, J.-H., Kelly, A.G., Pudlo, N.A., Martens, E.C., Boraston, A.B., 2012. Bacteria of the human gut microbiome catabolize red seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19786–19791.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual.
- Hempel, F., Maurer, M., Brockmann, B., Mayer, C., Biedenkopf, N., Kelterbaum, A., Becker, S., Maier, U.G., 2017. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the Marburg virus nucleoprotein. *Microbial cell factories* 16, 1–10.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A.M., Fenelon, M., Tiwari, B., 2017. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods* 6, 53.
- Hernández, D., Solana, M., Riaño, B., García-González, M.C., Bertucco, A., 2014. Biofuels from microalgae: lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. *Bioresource technology* 170, 370–378.
- Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge university press.
- Hønsvall, B.K., Altin, D., Robertson, L.J., 2016. Continuous harvesting of microalgae by new microfluidic technology for particle separation. *Bioresource technology* 200, 360–365.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M.K., 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering* 2010.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., Lee, D.-J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances* 36, 54–67.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal* 54, 621–639.
- Hu, S., Fan, X., Qi, P., Zhang, X., 2019. Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *Journal of functional foods* 56, 333–341.
- Hu, X., Yang, X.Q., Li, L.H., Wu, Y.Y., Lin, W.L., Huang, H., Yang, S.L., 2015. Antioxidant properties of microalgae protein hydrolysates prepared by neutral protease digestion. *Applied Mechanics and Materials* 707, 149–153.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products* 69, 443–449.
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., Kaymak-Ertekin, F., 2018. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis* 70, 78–88.
- Ingebrigtsen, R.A., Hansen, E., Andersen, J.H., Eilertsen, H.C., 2016. Light and temperature effects on bioactivity in diatoms. *Journal of Applied Phycology* 28, 939–950.
- Innis, S.M., 2014. Omega-3 fatty acid biochemistry: perspectives from human nutrition. *Military medicine* 179, 82–87.
- Ismail, A., Bannenberg, G., Rice, H.B., Schutt, E., MacKay, D., 2016. Oxidation in EPA-and DHA-rich oils: an overview. *Lipid Technology* 28, 55–59.
- J Boohaker, R., W Lee, M., Vishnubhotla, P., LM Perez, J., R Khaled, A., 2012. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Current medicinal chemistry* 19, 3794–3804.
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M.M., Deprá, M.C., Sartori, R.B., Dias, R.R., Zepka, L.Q., 2019. Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science* 25, 1–7.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and bioengineering* 81, 193–210.
- Jimenez-Lopez, C., Pereira, A.G., Lourenço-Lopes, C., García-Oliveira, P., Cassani, L., Fraga-Corral, M., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., 2021. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food chemistry* 341, 128262.



John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology* 102, 186–193.

Joshi, S.M., Bera, M.B., Panesar, P.S., 2014. Extrusion cooking of maize/spirulina mixture: factors affecting expanded product characteristics and sensory quality. *Journal of food processing and preservation* 38, 655–664.

Ju, Z.Y., Deng, D.-F., Dominy, W.G., Forster, I.P., 2011. Pigmentation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by dietary astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 42, 633–644.

Karemore, A., Pal, R., Sen, R., 2013. Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. *Algal Research* 2, 113–121.

Kawai, T., Zhang, Z.-W., Moon, C.-S., Shimbo, S., Watanabe, T., Matsuda-Inoguchi, N., Higashikawa, K., Ikeda, M., 2002. Comparison of urinary bromide levels among people in East Asia, and the effects of dietary intakes of cereals and marine products. *Toxicology letters* 134, 285–293.

Kehrer, J.P., 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50.

Kellam, S.J., Cannell, R.J.P., Owsianka, A.M., Walker, J.M., 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal* 23, 45–47.

Khalifa, S.A., Elias, N., Farag, M.A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M.-E.F., Moustafa, M.S., Abd El-Wahed, A., Al-Mousawi, S.M., Musharraf, S.G., 2019. Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. *Marine drugs* 17, 491.

Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories* 17, 1–21.

Khan, S.A., Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and sustainable energy reviews* 13, 2361–2372.

Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M., Nouri, F., 2021. Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Molecular biology reports* 48, 4757–4765.

Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M.C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., Raymundo, A., 2020. Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research* 50, 101998.

- Kiani, H., Aznar, R., Poojary, M.M., Tiwari, B.K., Halim, R., 2022. Chromatographic techniques to separate and identify bioactive compounds in microalgae. *Frontiers in Energy Research* 10, 904014.
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., Yang, J.-W., 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 31, 862–876.
- Kim, Y.-H., Choi, Y.-K., Park, J., Lee, S., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Park, T.-J., Kim, Y.H., Lee, S.H., 2012. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresource technology* 109, 312–315.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N.R., Singh, R., 2013. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 20, 642–656.
- Kissoudi, M., Sarakatsianos, I., Samanidou, V., 2018. Isolation and purification of food-grade C-phycoerythrin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection. *Journal of separation science* 41, 975–981.
- Kitazato, K., Wang, Y., Kobayashi, N., 2007. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. *Drug Discov Ther* 1, 14–22.
- Klamczynska, B., Mooney, W.D., 2017. Heterotrophic microalgae: a scalable and sustainable protein source, in: *Sustainable Protein Sources*. Elsevier, pp. 327–339.
- Klein-Marcuschamer, D., Simmons, B.A., Blanch, H.W., 2011. Techno-economic analysis of a lignocellulosic ethanol biorefinery with ionic liquid pre-treatment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 5, 562–569.
- Kondo, S., Hori, K., Sasaki-Sekimoto, Y., Kobayashi, A., Kato, T., Yuno-Ohta, N., Nobusawa, T., Ohtaka, K., Shimojima, M., Ohta, H., 2016. Primitive extracellular lipid components on the surface of the charophytic alga *Klebsormidium flaccidum* and their possible biosynthetic pathways as deduced from the genome sequence. *Frontiers in Plant Science* 7, 952.
- Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., Show, P.-L., 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness* 8, 16–24.
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M., Miyachi, S., 1988. Characterization of the pyrenoid isolated from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Particulate form of RuBisCO protein. *Protoplasma* 144, 17–24.
- Kumari, V.C., Patil, S.M., Ramu, R., Shirahatti, P.S., Kumar, N., Sowmya, B.P., Egbuna, C., Uche, C.Z., Patrick-Iwuanyanwu, K.C., 2022. Chromatographic techniques: types, principles, and applications, in: *Analytical Techniques in Biosciences*. Elsevier, pp. 73–101.

- Lafarga, T., 2019. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. *Algal Research* 41, 101566.
- Lafarga, T., Ación-Fernández, F.G., Castellari, M., Villaró, S., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I., 2019. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. *Lwt* 111, 167–174.
- Laitinen, A., 1999. Supercritical fluid extraction of organic compounds from solids and aqueous solutions.
- Lammens, T.M., Franssen, M.C.R., Scott, E.L., Sanders, J.P.M., 2012. Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals. *Biomass and Bioenergy* 44, 168–181.
- Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R.M., Sinnecker, P., 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food research international* 38, 885–891.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I., 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC plant biology* 11, 1–16.
- Lauritano, C., Andersen, J.H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K.Ø., Romano, G., Ianora, A., 2016. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in marine science* 3, 68.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization (FAO).
- Lee, J.-C., Hou, M.-F., Huang, H.-W., Chang, F.-R., Yeh, C.-C., Tang, J.-Y., Chang, H.-W., 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer cell international* 13, 1–7.
- Lee, R.E., 2018. *Phycology*. Cambridge university press.
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., Jiang, Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry* 102, 771–776.
- Li, H.-B., Fan, K.-W., Chen, F., 2006. Isolation and purification of canthaxanthin from the microalga *Chlorella zofingiensis* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of separation science* 29, 699–703.

- Li, Q., Jiang, X., He, Y., Li, L., Xian, M., Yang, J., 2010. Evaluation of the biocompatible ionic liquid 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphite pretreatment of corn cob for improved saccharification. *Applied microbiology and biotechnology* 87, 117–126.
- Li, W.K., 1980. Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics. *Primary productivity in the sea* 259–279.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W., 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology* 25, 311–318.
- Li-Beisson, Y., Thelen, J.J., Fedosejevs, E., Harwood, J.L., 2019. The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 74, 31–68.
- Lin, K.-H., Lin, K.-C., Lu, W.-J., Thomas, P.-A., Jayakumar, T., Sheu, J.-R., 2015. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes in vitro and ex vivo. *International journal of molecular sciences* 17, 44.
- Lisboa, C.R., Pereira, A.M., Ferreira, S.P., Costa, J.A.V., 2014. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Journal of Engineering Research and Applications* 4, 29–38.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Lanfer Marquez, U.M., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology* 39, 17–32.
- Lu, Y., Xu, J., 2015. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in plant science* 20, 273–282.
- Lubzens, E., Zmora, O., Stottrup, J., McEvoy, L., 2003. Production and nutritional value of rotifers. *Live feeds in marine aquaculture* 300–303.
- Maalej, A., Dahmen-Ben Moussa, I., Karray, F., Chamkha, M., Sayadi, S., 2022. Olive oil by-product's contribution to the recovery of phenolic compounds from microalgal biomass: biochemical characterization, anti-melanogenesis potential, and neuroprotective effect. *Biomass Conversion and Biorefinery* 1–13.
- Machado Jr, F.R., Reis, D.F., Boschetto, D.L., Burkert, J.F., Ferreira, S.R., Oliveira, J.V., Burkert, C.A.V., 2014. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. *Industrial Crops and Products* 54, 17–21.

- Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M., Prates, J.A., 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock science* 205, 111–121.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997. *Brock biology of microorganisms*. Prentice hall Upper Saddle River, NJ.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., 2021. Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20, 515–547.
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., 2016. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* 109, 282–296.
- Manning, S.R., 2022. Microalgal lipids: Biochemistry and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 74, 1–7.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology* 96, 631–645.
- Maroneze, M.M., Zepka, L.Q., Lopes, E.J., Pérez-Gálvez, A., Roca, M., 2019. Chlorophyll oxidative metabolism during the phototrophic and heterotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Antioxidants* 8, 600.
- Martinez Angulo, L.D., Ramirez Merida, L.G., 2017. Current status of microalgae producers companies for food and food supplements in Latin America.
- Martín-Girela, I., Albero, B., Tiwari, B.K., Miguel, E., Aznar, R., 2020. Screening of contaminants of emerging concern in microalgae food supplements. *Separations* 7, 28.
- Marti-Quijal, F.J., Zamuz, S., Galvez, F., Roohinejad, S., Tiwari, B.K., Gómez, B., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., 2018. Replacement of soy protein with other legumes or algae in turkey breast formulation: Changes in physicochemical and technological properties. *Journal of food processing and preservation* 42, e13845.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews* 14, 217–232.
- Mathimani, T., Pugazhendhi, A., 2019. Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 17, 326–330.

- Matos, Â.P., 2017. The impact of microalgae in food science and technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 94, 1333–1350.
- Melis, A., Happe, T., 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant physiology* 127, 740–748.
- Melo, H.M., Santos, L.E., Ferreira, S.T., 2019. Diet-derived fatty acids, brain inflammation, and mental health. *Frontiers in neuroscience* 13, 439762.
- Mennella, L., Tosco, D., Alberti, F., Cembalo, L., Crescimanno, M., Del Giudice, T., Galati, A., Moglie, M., Scardera, A., Schifani, G., 2020. Perspectives and challenges of small scale plant microalgae cultivation. Evidences from Southern Italy. *Algal Research* 45, 101693.
- Merchant, R.E., Andre, C.A., 2001. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Alternative therapies in health and medicine* 7, 79–92.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology* 17, 477–489.
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S.A., Ianora, A., Russo, G.L., Buttino, I., Mazzarella, G., Laabir, M., Cabrini, M., 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature* 402, 173–176.
- Mohammadi-Gouraji, E., Soleimanian-Zad, S., Ghiaci, M., 2019. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. *Lwt* 102, 230–236.
- Molino, A., Mehariya, S., Di Sanzo, G., Larocca, V., Martino, M., Leone, G.P., Marino, T., Chianese, S., Balducchi, R., Musmarra, D., 2020. Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization* 36, 196–209.
- Morales-Jiménez, M., Gouveia, L., Yáñez-Fernández, J., Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B.E., 2020. Production, preparation and characterization of microalgae-based biopolymer as a potential bioactive film. *Coatings* 10, 120.
- Moreira, J.B., Vaz, B. da S., Cardias, B.B., Cruz, C.G., Almeida, A.C.A. de, Costa, J.A.V., Morais, M.G. de, 2022. Microalgae polysaccharides: an alternative source for food production and sustainable agriculture. *Polysaccharides* 3, 441–457.

- Morocho-Jácome, A.L., Ruscinc, N., Martinez, R.M., de Carvalho, J.C.M., Santos de Almeida, T., Rosado, C., Costa, J.G., Velasco, M.V.R., Baby, A.R., 2020. (Bio) Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 9513–9522.
- Mostafa, S.S., 2012. Microalgal biotechnology: prospects and applications. *Plant science* 12, 276–314.
- Mourelle, M.L., Gómez, C.P., Legido, J.L., 2017. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics* 4, 46.
- Mouritsen, O.G., Dawczynski, C., Duelund, L., Jahreis, G., Vetter, W., Schröder, M., 2013. On the human consumption of the red seaweed dulse (*Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr). *Journal of Applied Phycology* 25, 1777–1791.
- MU, N., Mehar, J.G., Mudliar, S.N., Shekh, A.Y., 2019. Recent advances in microalgal bioactives for food, feed, and healthcare products: commercial potential, market space, and sustainability. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 18, 1882–1897.
- Mudimu, O., Rybalka, N., Bauersachs, T., Born, J., Friedl, T., Schulz, R., 2014. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects. *Metabolites* 4, 373–393.
- Muhamad, I.I., Zulkifli, N., Lazim, N.A.M., 2019. Bioactive algal-derived polysaccharides: Multi-functionalization, therapeutic potential and biomedical applications. *Current pharmaceutical design* 25, 1147–1162.
- Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of applied phycology* 12, 527–534.
- Murray, R.G.E., 1984. The higher taxa, or, a place for everything...? *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1, 31–34.
- Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology* 150, 51–56.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource technology* 102, 57–70.
- Nagarajan, D., Varjani, S., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2021. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae—nutritive value and techno-functional components. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 150, 111549.

- Naikoo, M.I., Dar, M.I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F.A., Naushin, F., 2019. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules* 157–168.
- Niklas, K.J., Cobb, E.D., Matas, A.J., 2017. The evolution of hydrophobic cell wall biopolymers: from algae to angiosperms. *Journal of Experimental Botany* 68, 5261–5269.
- Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35, 308–326.
- Novoveská, L., Ross, M.E., Stanley, M.S., Pradelles, R., Wasiolek, V., Sassi, J.-F., 2019. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine drugs* 17, 640.
- Odum, H.T., 1971. *Environment, power, and society*. [stressing energy language and energy analysis].
- O’Kelly, C.J., 1993. *Relationships of eukaryotic algal groups to other protists*. CRC Press Boca Raton.
- Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H.M., Guedes, A.C., 2020. Pigments from microalgae, in: *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Elsevier, pp. 465–492.
- Palenik, B., Haselkorn, R., 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* 355, 265–267.
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S.V., Ghosh, T., Dubey, S., Mishra, S., 2017. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource technology* 244, 1216–1226.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* 5, e47.
- Pan-utai, W., lamtham, S., 2019. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. *Process Biochemistry* 82, 189–198.
- Parsaeimehr, A., Sun, Z., Dou, X., Chen, Y.-F., 2015. Simultaneous improvement in production of microalgal biodiesel and high-value alpha-linolenic acid by a single regulator acetylcholine. *Biotechnology for biofuels* 8, 1–10.
- Pasquet, V., Morisset, P., Ihammouine, S., Chepied, A., Aumailley, L., Berard, J.-B., Serive, B., Kaas, R., Lanneluc, I., Thiery, V., 2011. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. *Marine drugs* 9, 819–831.



- Patel, A.K., Vadrale, A.P., Singhania, R.R., Michaud, P., Pandey, A., Chen, S.-J., Chen, C.-W., Dong, C.-D., 2023. Algal polysaccharides: current status and future prospects. *Phytochemistry Reviews* 22, 1167–1196.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H.R., 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15, 1–9.
- Paull, J., 2015. The threat of genetically modified organisms (GMOs) to organic agriculture: A case study update. *Agriculture & Food* 3, 56–63.
- Pawlik-Skowrońska, B., 2003. Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquatic Botany* 75, 189–198.
- Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S.J., 2019. Comparison of diatoms and dinoflagellates from different habitats as sources of PUFAs. *Marine drugs* 17, 233.
- Pereira, C.G., Meireles, M.A.A., 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 3, 340–372.
- Perera, D., Soysa, P., Wijeratne, S., 2016. Polyphenols contribute to the antioxidant and antiproliferative activity of *Phyllanthus debilis* plant in-vitro. *BMC complementary and alternative medicine* 16, 1–9.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research* 45, 11–36.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G.G.-B., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51, 450–455.
- Poojary, M.M., Barba, F.J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D.A., Juliano, P., 2016. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine drugs* 14, 214.
- Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J.J., Gunnison, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F., Strait, L.A., Spoehr, H.A., Hardin, G.J., Milner, H.W., 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science* 99, 351–352.
- Prestegard, S.K., Knutsen, G., Herfindal, L., 2014. Adenosine content and growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): effect of salinity, light, temperature and nitrate. *Diatom research* 29, 361–369.

- Prestegard, S.K., Oftedal, L., Coyne, R.T., Nygaard, G., Skjærven, K.H., Knutsen, G., Døskeland, S.O., Herfindal, L., 2009. Marine benthic diatoms contain compounds able to induce leukemia cell death and modulate blood platelet activity. *Marine Drugs* 7, 605–623.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 57, 287–293.
- Ramana, K., Xavier, J., Sharma, R., 2017. Recent trends in pharmaceutical biotechnology. *Pharm Biotechnol Curr Res* 1, 5.
- Rammuni, M.N., Ariyadasa, T.U., Nimarshana, P.H.V., Attalage, R.A., 2019. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. *Food chemistry* 277, 128–134.
- Randhir, A., Laird, D.W., Maker, G., Trengove, R., Moheimani, N.R., 2020. Microalgae: a potential sustainable commercial source of sterols. *Algal Research* 46, 101772.
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., Arumugam, M., 2015. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Frontiers in Energy Research* 2, 61.
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in environmental science and bio/technology* 12, 153–164.
- Raven, J.A., Beardall, J., 2003. Carbohydrate metabolism and respiration in algae, in: *Photosynthesis in Algae*. Springer, pp. 205–224.
- Remize, M., Brunel, Y., Silva, J.L., Berthon, J.-Y., Filaire, E., 2021. Microalgae n-3 PUFAs production and use in food and feed industries. *Marine drugs* 19, 113.
- Reverchon, E., De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids* 38, 146–166.
- Reyes, F.A., Mendiola, J.A., Ibanez, E., del Valle, J.M., 2014. Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO<sub>2</sub>-expanded ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids* 92, 75–83.
- Riccio, G., Lauritano, C., 2019. Microalgae with immunomodulatory activities. *Marine drugs* 18, 2.
- Richmond, A., Hu, Q., 2013. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*.
- Rindi, F., McIvor, L., Sherwood, A.R., Friedl, T., Guiry, M.D., Sheath, R.G., 2007. Molecular phylogeny of the green algal order Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) 1. *Journal of Phycology* 43, 811–822.

- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 394–404.
- Rocha, D.N., Martins, M.A., Soares, J., Vaz, M.G.M.V., de Oliveira Leite, M., Covell, L., Mendes, L.B.B., 2019. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. *Bioresource technology* 289, 121644.
- Roopnarain, A., Gray, V.M., Sym, S.D., 2014. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource technology* 156, 408–411.
- Ruggiero, I., Terracciano, M., Martucci, N.M., De Stefano, L., Migliaccio, N., Tatè, R., Rendina, I., Arcari, P., Lamberti, A., Rea, I., 2014. Diatomite silica nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale research letters* 9, 1–7.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., Foubert, I., 2014. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food chemistry* 160, 393–400.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Foubert, I., 2012. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 189–198.
- Safi, C., Frances, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.-Y., 2015. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal research* 8, 61–68.
- Saini, R.K., Keum, Y.-S., 2018. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry* 240, 90–103.
- Salinas-Salazar, C., Saul Garcia-Perez, J., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Iqbal, H.M., Parra-Saldívar, R., 2019. Methods for extraction of valuable products from microalgae biomass. *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment* 245–263.
- Sansone, C., Braca, A., Ercolesi, E., Romano, G., Palumbo, A., Casotti, R., Francone, M., Ianora, A., 2014. Diatom-derived polyunsaturated aldehydes activate cell death in human cancer cell lines but not normal cells. *PLoS One* 9, e101220.
- Sansone, C., Galasso, C., Orefice, I., Nuzzo, G., Luongo, E., Cutignano, A., Romano, G., Brunet, C., Fontana, A., Esposito, F., 2017. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific Reports* 7, 41215.

- Santangelo, R., Silvestrini, A., Mancuso, C., 2019. Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food and Chemical Toxicology* 123, 42–49.
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., Reina, G.G.-B., Señorans, F.J., Ibáñez, E., 2009. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1213–1218.
- Sanzo, G.D., Mehariya, S., Martino, M., Larocca, V., Casella, P., Chianese, S., Musmarra, D., Balducchi, R., Molino, A., 2018. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Marine drugs* 16, 334.
- Sathasivam, R., Ki, J.-S., 2018. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine drugs* 16, 26.
- Sayre, R.T., Wagner, R.E., Siripornadulsil, S., Farias, C., 2001. Use of *Chlamydomonas reinhardtii* and other transgenic algae in food or feed for delivery of antigens. *Adv Appl Sci Res* 4, 220–5.
- Scaglioni, P.T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V.B., Abreu, P.C., Badiale-Furlong, E., 2018. Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. *Food technology and biotechnology* 56, 344.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research* 1, 20–43.
- Scoglio, S., Benedetti, Y., Benvenuti, F., Battistelli, S., Canestrari, F., Benedetti, S., 2014. Selective monoamine oxidase B inhibition by an *Aphanizomenon flos-aquae* extract and by its constitutive active principles phycocyanin and mycosporine-like amino acids. *Phytomedicine* 21, 992–997.
- Shahid, A., Khan, F., Ahmad, N., Farooq, M., Mehmood, M.A., 2020. Microalgal carbohydrates and proteins: Synthesis, extraction, applications, and challenges. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products* 433–468.
- Shahidi, F., Yeo, J., 2020. Should the in vitro colorimetric assays in antioxidant and lipid oxidation evaluation be abandoned?: A critical review focusing on bioactive molecule screening assays in in vitro and in vivo models. *Journal of Food Bioactives* 9.
- Shankar, P.D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V.S., Arvindnarayan, S., Kumar, G., 2016. A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme and microbial technology* 95, 28–44.

- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. *Journal of Food Engineering* 124, 105–116.
- Shen, C.-T., Chen, P.-Y., Wu, J.-J., Lee, T.-M., Hsu, S.-L., Chang, C.-M.J., Young, C.-C., Shieh, C.-J., 2011. Purification of algal anti-tyrosinase zeaxanthin from *Nannochloropsis oculata* using supercritical anti-solvent precipitation. *The Journal of Supercritical Fluids* 55, 955–962.
- Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55–88.
- Sierra, L.S., Dixon, C.K., Wilken, L.R., 2017. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Research* 25, 149–159.
- Silva, S.C., Ferreira, I.C., Dias, M.M., Barreiro, M.F., 2020. Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules* 25, 3406.
- Singh, J., Gu, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and sustainable energy reviews* 14, 2596–2610.
- Skjånes, K., Aesoy, R., Herfindal, L., Skomedal, H., 2021. Bioactive peptides from microalgae: Focus on anti-cancer and immunomodulating activity. *Physiologia Plantarum* 173, 612–623.
- Smerilli, A., Balzano, S., Maselli, M., Blasio, M., Orefice, I., Galasso, C., Sansone, C., Brunet, C., 2019. Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. *Antioxidants* 8, 154.
- Smetana, S., Sandmann, M., Rohn, S., Pleissner, D., Heinz, V., 2017. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. *Bioresource technology* 245, 162–170.
- Soares, A.T., Marques Júnior, J.G., Lopes, R.G., Derner, R.B., Antoniosi Filho, N.R., 2016. Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. microalgae. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27, 1083–1093.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, Jcm., Converti, A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 243, 217–224.
- Šoštarič, M., Klinar, D., Bricelj, M., Golob, J., Berovič, M., Likozar, B., 2012. Growth, lipid extraction and thermal degradation of the microalga *Chlorella vulgaris*. *New biotechnology* 29, 325–331.
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., Nikolov, Z.L., 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal research* 36, 175–192.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering* 101, 87–96.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science* 30, 3268–3295.
- Stephens, E., Ross, I.L., King, Z., Mussgnug, J.H., Kruse, O., Posten, C., Borowitzka, M.A., Hankamer, B., 2010. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature biotechnology* 28, 126–128.
- Suh, S.-S., Hong, J.-M., Kim, E.J., Jung, S.W., Chae, H., Kim, J.E., Kim, J.H., Kim, I.-C., Kim, S., 2019. Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas reticulata*, suppresses inflammation and carcinogenesis. *International journal of medical sciences* 16, 189.
- Sukla, L.B., Pradhan, N., Panda, S., Mishra, B.K., 2015. *Environmental Microbial Biotechnology*. Springer.
- Sun, P., Wong, C.-C., Li, Y., He, Y., Mao, X., Wu, T., Ren, Y., Chen, F., 2019. A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom *Nitzschia laevis*. *Food chemistry* 277, 566–572.
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., Huang, H., 2018. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for biofuels* 11, 1–16.
- Szabo, N.J., Matulka, R.A., Chan, T., 2013. Safety evaluation of whole algalin protein (wap) from *Chlorella protothecoides*. *Food and chemical toxicology* 59, 34–45.
- Taipale, S., Peltomaa, E., Salmi, P., 2020. Variation in  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids produced by different phytoplankton taxa at early and late growth phase. *Biomolecules* 10, 559.
- Taira, H., Aoki, S., Yamanoha, B., Taguchi, S., 2004. Daily variation in cellular content of UV-absorbing compounds mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Scrippsiella sweeneyae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 75, 145–155.
- Takahashi, K., Hosokawa, M., Kasajima, H., Hatanaka, K., Kudo, K., Shimoyama, N., Miyashita, K., 2015. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. *Oncology letters* 10, 1463–1467.
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., Motilva, V., 2015. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine drugs* 13, 6152–6209.

- Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H., 2012. Cancer chemoprevention by caroteno. *Molecules* 17, 3202–3242.
- Tarafder, A., Miller, L., 2021. Chiral chromatography method screening strategies: Past, present and future. *Journal of Chromatography A* 1638, 461878.
- Thomas, F., Barbeyron, T., Tonon, T., Génicot, S., Czjzek, M., Michel, G., 2012. Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine Flavobacteriia to their independent transfers to marine Proteobacteria and human gut Bacteroides. *Environmental microbiology* 14, 2379–2394.
- Tinoco, N.A., Teixeira, C.M.L., de Rezende, C.M., 2015. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. *Revista Virtual de Química* 7, 1421–1440.
- Tounsi, L., Ben Hlima, H., Hentati, F., Hentati, O., Derbel, H., Michaud, P., Abdelkafi, S., 2023. Microalgae: a promising source of bioactive phycobiliproteins. *Marine Drugs* 21, 440.
- Tran, H.N.K., Kim, J.A., Youn, U.J., Kim, S., Woo, M.H., Min, B.S., 2019. Investigation of chemical compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF108 (*Chlamydomonadaceae*). *Biochemical systematics and ecology* 83, 4–6.
- Tredici, M.R., Biondi, N., Ponis, E., Rodolfi, L., Zittelli, G.C., 2009. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses, in: *New Technologies in Aquaculture*. Elsevier, pp. 610–676.
- Trivedi, T., Jain, D., Mulla, N.S., Mamatha, S.S., Damare, S.R., Sreepada, R.A., Kumar, S., Gupta, V., 2019. Improvement in biomass, lipid production and biodiesel properties of a euryhaline *Chlorella vulgaris* NIOCCV on mixotrophic cultivation in wastewater from a fish processing plant. *Renewable energy* 139, 326–335.
- Udayan, A., Arumugam, M., Pandey, A., 2017. Nutraceuticals from algae and cyanobacteria, in: *Algal Green Chemistry*. Elsevier, pp. 65–89.
- Udayan, A., Pandey, A.K., Sharma, P., Sreekumar, N., Kumar, S., 2021. Emerging industrial applications of microalgae: challenges and future perspectives. *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 1, 411–431.
- Van der Spiegel, M., Noordam, M.Y., Van der Fels-Klerx, H.J., 2013. Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 12, 662–678.

- Velasco, J., Dobarganes, C., Márquez-Ruiz, G., 2003. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Grasas y aceites* 54, 304–314.
- Venugopal, V., 2016. *Marine polysaccharides: Food applications*. CRC press.
- Vieira, M.V., Pastrana, L.M., Fuciños, P., 2020. Microalgae encapsulation systems for food, pharmaceutical and cosmetics applications. *Marine drugs* 18, 644.
- Vijayakumar, S., Menakha, M., 2015. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *Journal of Acute Medicine* 5, 15–23.
- Villaró, S., Ciardi, M., Morillas-España, A., Sánchez-Zurano, A., Acién-Fernández, G., Lafarga, T., 2021. Microalgae derived astaxanthin: Research and consumer trends and industrial use as food. *Foods* 10, 2303.
- Villarruel-López, A., Ascencio, F., Nuño, K., 2017. Microalgae, a potential natural functional food source—a review. *Polish journal of food and nutrition sciences* 67.
- Visca, A., Di Caprio, F., Spinelli, R., Altimari, P., Cicci, A., Iaquaniello, G., Toro, L., Pagnanelli, F., 2017. Microalgae cultivation for lipids and carbohydrates production. *Chemical engineering transactions* 57, 127–132.
- Vonshak, A., 2017. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, in: *Handbook of Microalgal Mass Culture (1986)*. CRC Press, pp. 117–146.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 79, 707–718.
- Wang, H.-M.D., Chen, C.-C., Huynh, P., Chang, J.-S., 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource technology* 184, 355–362.
- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances* 27, 195–226.
- Wang, J., Hu, X., Chen, J., Wang, T., Huang, X., Chen, G., 2022. The extraction of  $\beta$ -carotene from microalgae for testing their health benefits. *Foods* 11, 502.
- Wang, Z.Z., Liu, G.H., Gong, D.H., Qiao, C., Yao, Y., Mu, Q.E., 2012. Tracking sources of arsenic in the *Spirulina Platensis* power from the Ordos Alkali lake in Inner Mongolia. *Chinese Agr Sci Bull* 28, 108–111.



- Wei, F., Gao, G.-Z., Wang, X.-F., Dong, X.-Y., Li, P.-P., Hua, W., Wang, X., Wu, X.-M., Chen, H., 2008. Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. *Ultrasonics sonochemistry* 15, 938–942.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E., Brawley, S.H., 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of applied phycology* 29, 949–982.
- Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H.P., Susilowati, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L., 2017. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti, in: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, p. 012067.
- Wiessner, W., Schnepf, E., Starr, R.C., 1995. *Algae, environment and human affairs*. England: Biopress Ltd.; ISBN 0-948737-30-1.
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., Ying-Xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology* 101, 5494–5500.
- Xiong, F., Kopecky, J., Nedbal, L., 1999. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). *Aquatic Botany* 63, 37–49.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., Takriff, M.S., 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 21, 1–10.
- Yamaguchi, K., 1996. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of applied phycology* 8, 487–502.
- Yan, N., Fan, C., Chen, Y., Hu, Z., 2016. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International journal of molecular sciences* 17, 962.
- Yasuhara-Bell, J., Lu, Y., 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral research* 86, 231–240.
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., Wu, G.-H., 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnology advances* 26, 352–360.
- Yoo, G., Park, W.-K., Kim, C.W., Choi, Y.-E., Yang, J.-W., 2012. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource technology* 123, 717–722.

Yoshida, H., Yanai, H., Ito, K., Tomono, Y., Koikeda, T., Tsukahara, H., Tada, N., 2010. Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 209, 520–523.

Yu, J., Ma, D., Qu, S., Liu, Y., Xia, H., Bian, F., Zhang, Y., Huang, C., Wu, R., Wu, J., 2020. Effects of different probiotic combinations on the components and bioactivity of *Spirulina*. *Journal of basic microbiology* 60, 543–557.

Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M.A., Domingo, J.C., 2008. Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR $\gamma$ : RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *Journal of Leucocyte Biology* 84, 1172–1182.

Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Roca, M., 2019. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science* 26, 94–100.

Zhao, W., Duan, M., Zhang, X., Tan, T., 2018. A mild extraction and separation procedure of polysaccharide, lipid, chlorophyll and protein from *Chlorella* spp. *Renewable energy* 118, 701–708.

Zhou, L., Li, K., Duan, X., Hill, D., Barrow, C., Dunshea, F., Martin, G., Suleria, H., 2022. Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. *Food Bioscience* 49, 101932.

Zoccali, M., Giuffrida, D., Salafia, F., Socaciu, C., Skjånes, K., Dugo, P., Mondello, L., 2019. First apocarotenoids profiling of four microalgae strains. *Antioxidants* 8, 209.

[www.sciencephoto-gallery.com](http://www.sciencephoto-gallery.com), [Accessed 20/01/2024]

<https://www.enhancemicroalgae.eu/wp-content/uploads/2020/05/EMA-Strain-catalogue-2nd-Edition.pdf> [Accessed 30/01/2024]