



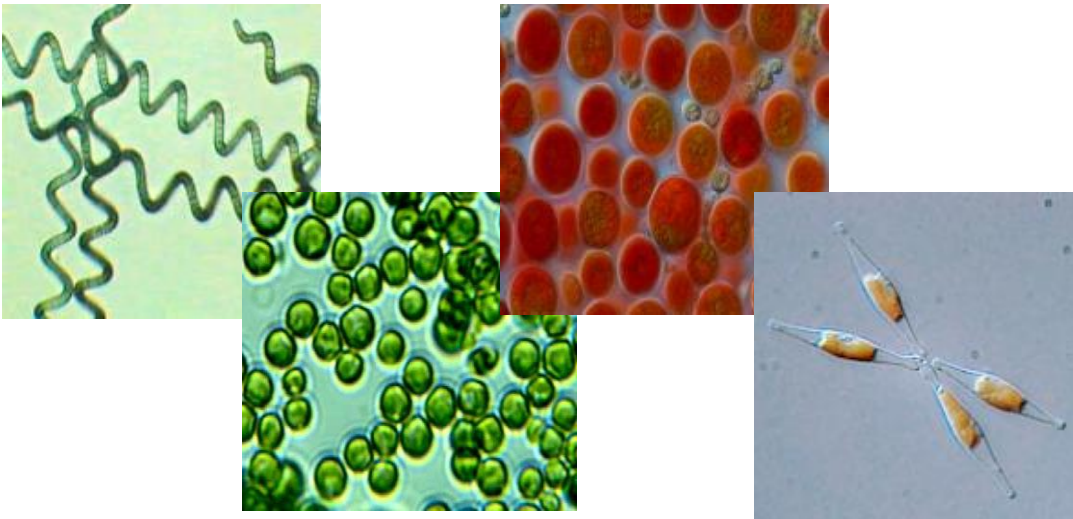
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ II: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ

ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Ανάπτυξη Εκχυλισμάτων από Μικροφύκη και Μελέτη της
Αντιοξειδωτικής Δράσης τους και της Περιεκτικότητάς τους σε
Βιοδραστικά Συστατικά



Διπλωματική Εργασία
Στραμάρκου Μαρίνα

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Μαγδαληνή Κροκίδα

ΑΘΗΝΑ 2016

*Στους γονείς μου,
Μαργαρίτα και Θεόδωρο*

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών και Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Μαγδαληνής Κροκίδα.

Με την ευκαιρία ολοκλήρωσης αυτής της προσπάθειας, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων την υπεύθυνη μου, κυρία Μαγδαληνή Κροκίδα για την εμπιστοσύνη και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε για την ανάθεση του εν λόγω θέματος και την συνεχή στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησής του. Οι πολύτιμες γνώσεις και οι συμβουλές της αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και με ενέπνευσαν να ακολουθήσω τον τομέα Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων.

Πολλά θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να πω στις Διδάκτορα Σοφία Παπαδάκη και Υποψήφια Διδάκτορα Κωνσταντίνα Κυριακοπούλου, οι οποίες ήταν πάντα πρόθυμες και διαθέσιμες να επιλύσουν τυχόν απορίες και προβληματισμούς μου και να με εισάγουν ουσιαστικά σε ένα νέο, για μένα, εργαστηριακό περιβάλλον. Η βοήθειά τους ήταν ανεκτίμητη και η συνεργασία μας, από μέρους μου, ήταν άψογη. Ευελπιστώ ότι η φιλία που αναπτύχθηκε μεταξύ μας θα διαρκέσει για καιρό.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου κα. Αθηνά Παππά και κ. Ευάγγελο Τόπακα για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και τις συμβουλές τους σε θέματα συμπεριφοράς σε ένα ερευνητικό εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ολόψυχη αγάπη τους, την αμέριστη στήριξή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου και την ενθάρρυνσή τους στις όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2016

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι η ανάπτυξη εκχυλισμάτων από μικροφύκη πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και βιοδραστικές ουσίες με υψηλή βιολογική αξία και ικανών να ενταχθούν σε συστήματα τροφίμων.

Στις μέρες μας, η αξιοποίηση των θαλάσσιων πόρων αποτελεί πυλώνα της βιοοικονομίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα μικροφύκη αποτελούν έναν θαλάσσιο πόρο με μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον, παρουσιάζοντας ευρύ φάσμα εφαρμογών, που αφορά όχι μόνο τις ιχθυοκαλλιέργειες, αλλά και άλλους βιομηχανικούς τομείς. Οι βιομηχανίες χημικών, φαρμάκων, καλλυντικών και ενέργειας διερευνούν τις δυνατότητες των μικροφυκών, αλλά ο τομέας των τροφίμων, είναι αυτός που ενδεχομένως επωφελείται περισσότερο από την τεχνολογία τους. Τα μικροφύκη αποτελούν μια ιδιαίτερα ελκυστική πηγή ποικίλων μορίων υψηλής αξίας, όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και βιταμίνες. Η υψηλή περιεκτικότητά τους, όμως, σε φυσικές χρωστικές, που λειτουργούν και ως αντιοξειδωτικά, όπως τα καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένων του β-καροτενίου και της ασταξανθίνης, καθώς και οι χλωροφύλλες, είναι το χαρακτηριστικό που προσδίδει στα μικροφύκη υψηλή εμπορική αξία.

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία, τέσσερα είδη μικροφυκών: *Spirulina Platensis*, *Chlorella Vulgaris*, *Haematococcus Pluvialis* και το διάτομο *Phaeodactylum Tricornutum* επιλέχθηκαν ως πρώτες ύλες για την ανάκτηση λειτουργικών εκχυλισμάτων. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η φιλική προς το περιβάλλον και υψηλού βιομηχανικού ενδιαφέροντος μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες στις βέλτιστες συνθήκες (χρόνος εκχύλισης 5 min, θερμοκρασία 30°C, ισχύς υπερήχων 450 Watt και αναλογία στερεού: διαλύτη 1 gr ξηρού βάρους: 20 ml διαλύτη). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οργανικοί πετροχημικής προέλευσης, όπως η αιθανόλη, το εξάνιο και η ακετόνη, καθώς και φυτικής προέλευσης, όπως το λεμονένιο, το σογιέλαιο και το έλαιο με μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια (MCT). Η τεχνική της εκχύλισης εφαρμόστηκε σε φρέσκα και ξηρά δείγματα με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της ξήρανσης στην ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών. Το περιεχόμενο όλων των εκχυλισμάτων σε ολικά καροτενοειδή, β-καροτένιο και χλωροφύλλες προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την φασματομετρία UV-Vis. Εκτός αυτών, στην περίπτωση της *Spirulina Platensis* μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνη και στην περίπτωση του *Haematococcus Pluvialis*, η περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και της βιομάζας των μικροφυκών αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.

Η *Spirulina Platensis* και η *Chlorella Vulgaris* αποδείχθηκαν πλούσιες πηγές καροτενοειδών και χλωροφυλλών, ενώ η μέθοδος DPPH απέδειξε ότι ο *Haematococcus Pluvialis* και το *Phaeodactylum Tricornutum* εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Λαμβάνοντας υπόψη την φύση του διαλύτη, η ακετόνη και το

εξάνιο μπορούν να αντικατασταθούν από διαλύτες ικανούς να εφαρμοστούν σε συστήματα τροφίμων, όπως το νερό και η αιθανόλη στην εκχύλιση της *Chlorella Vulgaris* και της *Spirulina Platensis*, ενώ στην περίπτωση του *Phaeodactylum Tricornutum* το λεμονένιο αποδεικνύεται ο πλέον αποτελεσματικός στην ανάκτηση των καροτενοειδών. Τέλος, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη εμφανίζεται στα εκχυλίσματα του *Haematococcus Pluvialis* με σογιέλαιο.

Λέξεις Κλειδιά: μικροφύκη, καροτενοειδή, β-καροτένιο, ασταξανθίνη, χλωροφύλλες, αντιοξειδωτική δράση, εκχύλιση με υπερήχους,

Abstract

The purpose of the present diploma thesis is the development of microalgae extracts rich in antioxidants and bioactive substances with high biological value and able to be incorporated in food systems.

Nowadays, the exploitation of marine resources is raising big expectations within the EU bioeconomy. Microalgae are a marine resource, which exhibit large industrial interest, presenting a wide range of applications, involving not only fish farming, but also other industrial sectors. Chemical, pharmaceutical, cosmetic and biofuel industries investigate the potential of microalgae. However, food industry is maybe the one that benefits most from their technology. Microalgae are a particularly attractive source of high value molecules, such as proteins, fatty acids and vitamins. However, their high content in natural pigments that act as antioxidants, such as carotenoids, including beta-carotene and astaxanthin, and chlorophylls, is the feature that gives microalgae high commercial value.

In this study, four species of microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* were selected as raw materials for the recovery of multifunctional extracts. For this purpose, the environmentally friendly and of high industrial interest Ultrasonic assisted extraction (UAE) using different solvents was applied under the optimized conditions (Extraction Time 5 min, Temperature 30°C, Ultrasonic Power 450 Watt and Solid to Solvent ratio 1:20 grams dry weight per ml solvent). Organic solvents such as hexane, acetone and ethanol, as well as food grade solvents, such as limonene, soybean oil and medium chain triglycerides oil (MCT) were used. The Extraction technique was applied in fresh and dried samples, in order to study the effect of drying on the recovery of bioactive substances. The total carotenoid, β -carotene and chlorophyll content of the extracts was determined for all species using UV-Vis spectrometry. Moreover, in the case of *Spirulina platensis* the phycocyanin content was measured and in the case of *Haematococcus Pluvialis* the astaxanthin content was also measured. The microalgae biomass and the extracts were evaluated regarding their antiradical activity using the DPPH method.

Spirulina platensis and *Chlorella vulgaris* proved to be rich sources of carotenoids and chlorophylls, while the DPPH assay revealed that *Haematococcus pluvialis* and *Phaeodactylum tricornutum* exhibited the highest antiradical activity. Considering the nature of the solvent, acetone and hexane can be replaced by the food grade solvents of water and ethanol for the extraction of *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina Platensis*, while in the case of *Phaeodactylum Tricornutum* limonene was considered the most efficient solvent for the recovery of carotenoids. Finally, soybean oil extracts of *Haematococcus Pluvialis* displayed the highest astaxanthin content.

Keywords: microalgae, carotenoids, beta-carotene, astaxanthin, chlorophyll, antioxidant, ultrasonic assisted extraction

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	i
Abstract	iii
Πίνακας Περιεχομένων	I
Ευρετήριο Πινάκων.....	IV
Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	V
Κεφάλαιο 1. Μικροφύκη	1
1.1.Είδη Μικροφυκών	1
1.2.Χημική Σύσταση των Μικροφυκών.....	3
1.3. Εφαρμογές και χρήσεις μικροφυκών.....	4
1.3.1. Εφαρμογές στα Τρόφιμα και Ζωοτροφές	4
1.3.2. Εφαρμογές στην φαρμακευτική	15
1.3.3. Εφαρμογές στην Κοσμετολογία	15
1.3.4. Εφαρμογές ως εδαφοβελτιωτικά.....	15
1.3.5. Εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμων.....	16
1.3.6. Εφαρμογές στην διαχείριση αποβλήτων και απόβερων	17
1.3.7. Εφαρμογές στο περιβάλλον	18
1.4. Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών	19
1.4.1. Ανοικτού τύπου καλλιέργειες	20
1.4.2. Κλειστού τύπου καλλιέργειες	21
1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών.....	23
1.5.1. Φωτισμός	23
1.5.2. Θερμοκρασία.....	23
1.5.3. Θρεπτικά στοιχεία	23
1.5.4. Άνθρακας.....	23
1.5.5. Άζωτο.....	24
1.5.6. Φώσφορος.....	24
1.5.7. Αλατότητα	24
1.5.8. pH	25
Κεφάλαιο 2. Spirulina Platensis	26
2.1. Χημική Σύθεση.....	26
2.2. Εφαρμογες.....	27
2.3. Καλλιέργεια	28
Κεφάλαιο 3. Chlorella Vulgaris	29
3.1.Χημική Σύθεση.....	29

3.1.1. Πρωτεΐνες	29
3.1.2. Λιπίδια	29
3.1.3. Χρωστικές	29
3.2. Εφαρμογές.....	30
Κεφάλαιο 4. Haematococcus Pluvialis	31
4.1. Χημική Σύνθεση.....	31
4.2. Εφαρμογές.....	32
Κεφάλαιο 5. Phaeodactylum Tricornutum	33
5.1. Χημική Σύνθεση.....	33
5.2. Εφαρμογές.....	33
Κεφάλαιο 6. Ξήρανση	35
6.1. Λυοφιλίωση (Κρυοξήρανση, Ξήρανση με κατάψυξη- Freeze Drying)	35
6.2. Ηλιακή Ξήρανση (Solar Drying)	36
6.3. Επαγωγική Ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα (Hot Air drying).....	37
6.4. Ξήρανση Υπό Κενό (Vacuum Drying).....	38
Κεφάλαιο 7. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)	39
Κεφάλαιο 8. Spirulina Platensis	41
8.1. Υλικά	41
8.2. Μέθοδοι	41
8.2.1. Ξήρανση	41
8.2.2. Εκχύλιση	43
8.2.3. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου	44
8.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	48
8.3.1. Επίδραση της Ξήρανσης στα Βιοδραστικά Χαρακτηριστικά.....	48
8.3.2. Επίδραση της περιεχόμενης υγρασίας και του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και το βιοδραστικό περιεχόμενο.....	55
8.4. Συμπεράσματα	70
Κεφάλαιο 9. Chlorella Vulgaris	71
9.1. Υλικά	71
9.2. Μέθοδοι	71
9.2.1. Ξήρανση	71
9.2.2. Εκχύλιση	71
9.2.3. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου	72
9.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	73
9.3.1. Επίδραση της ξήρανσης στα βιοδραστικά χαρακτηριστικά.....	73

9.3.2. Επίδραση της περιεχόμενης υγρασίας και του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο	77
9.4. Συμπεράσματα	88
Κεφάλαιο 10. Haematococcus Pluvialis	90
10.1. Υλικά	90
10.2. Μέθοδοι	90
10.2.1. Εκχύλιση	90
10.2.2. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου	91
10.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	93
10.3.1. Επίδραση του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο	93
10.4. Συμπεράσματα	101
Κεφάλαιο 11. Phaeodactylum Tricornutum	102
11.1. Υλικά	102
11.2. Μέθοδοι	102
11.2.1. Εκχύλιση	102
11.2.2. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου	103
11.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	104
11.3.1. Επίδραση του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο του	104
11.4. Συμπεράσματα	111
Κεφάλαιο 12. Γενικά Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	113
Βιβλιογραφία	115

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των τεσσάρων φυκών που μελετήθηκαν	2
Πίνακας 2. Γενική Σύνθεση διάφορων τροφίμων και φυκών (% ξηρής μάζας).....	3
Πίνακας 3. Στοιχεία της αγοράς των προϊόντων από μικροφύκη	6
Πίνακας 4. Κατάσταση παραγωγής σημαντικότερων μικροφυκών	7
Πίνακας 5. Τα σημαντικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ΠΑΛΟ) από μικροφύκη.	8
Πίνακας 6. Σύγκριση μεταξύ των καροτενοειδών: β-καροτενίου και ασταξανθίνης (Spolaore et al. 2006).....	11
Πίνακας 7. Σύγκριση των μικροφυκών και άλλων πρώτων υλών βιοντίζελ (Priyadarshani & Rath 2012)	17
Πίνακας 8. Οι μέθοδοι καλλιέργειας για ορισμένα είδη μικροφυκών (Harun et al. 2010)	19
Πίνακας 9. Μερικοί παραγωγοί Σπιρουλίνας και η τοποθεσία τους (Holman & Malau-Aduli 2013).....	27
Πίνακας 10 Το περιεχόμενο της <i>Chlorella Vulgaris</i> σε χρωστικές για διάφορες συνθήκες ανάπτυξης (Safi et al. 2014).	30
Πίνακας 11. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος <i>Spirulina platensis</i> (SP).....	44
Πίνακας 12. Η ποσότητα εκχυλισμάτων και πέλετ και οι αποδόσεις αυτών για την νωπή και ξηρή <i>Spirulina Platensis</i>	56
Πίνακας 13. Ποσοστό β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή (%) στα εκχυλίσματα της <i>Spirulina Platensis</i> που ήταν δυνατό να προσδιορισθούν.....	64
Πίνακας 14. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος <i>Chlorella Vulgaris</i> (CV)	72
Πίνακας 15. Αναλογία β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή των εκχυλισμάτων της <i>Chlorella Vulgaris</i>	76
Πίνακας 16. Η ποσότητα εκχυλισμάτων και πέλετ και οι αποδόσεις αυτών για τα διάφορα είδη βιομάζας της <i>Chlorella Vulgaris</i>	78
Πίνακας 17. Ποσοστό του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων της <i>Chlorella Vulgaris</i>	84
Πίνακας 18. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος <i>Haematococcus Pluvialis</i> (HP)	90
Πίνακας 19. Αποτελέσματα εκχύλισης της ξηρής βιομάζας <i>Haematococcus Pluvialis</i> με τους διαλύτες ακετόνη, MCT, λεμονένιο και σογιέλαιο	93
Πίνακας 20. Απορρόφηση των καθαρών διαλυτών στα μήκη κύματος 750, 664, 647, 630, 510 και 480 nm.....	95
Πίνακας 21. Ποσοστό ασταξανθίνης στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	97
Πίνακας 22. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος <i>Phaeodactylum Tricornutum</i> (PT)	102
Πίνακας 23. Αποτελέσματα εκχύλισης της ξηρής βιομάζας <i>Phaeodactylum Tricornutum</i> με τους διαλύτες: νερό, MCT, εξάνιο και λεμονένιο	105
Πίνακας 24 Ποσοστό β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	108

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Συγκέντρωση Ολικών Καροτενοειδών των διαφόρων ειδών Βιομάζας <i>Spirulina Platensis</i>	48
Διάγραμμα 2 Συγκέντρωση χλωροφυλλών α,β και γ των διαφόρων ειδών βιομάζας <i>Spirulina Platensis</i>	50
Διάγραμμα 3. Συγκέντρωση Φυκοκυανίνης των διαφόρων ειδών Βιομάζας <i>Spirulina Platensis</i>	52
Διάγραμμα 4. Ανάκτηση των Βιοδραστικών Ενώσεων: Ολικά Καροτενοειδή, Χλωροφύλλη α και Φυκοκυανίνη για τα διάφορα είδη Βιομάζας <i>Spirulina Platensis</i>	54
Διάγραμμα 5. Αποδόσεις των Εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	57
Διάγραμμα 6. Αποδόσεις των Pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	59
Διάγραμμα 7. Συγκεντρώσεις Ολικών Καροτενοειδών στα Εκχυλίσματα της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	60
Διάγραμμα 8. Συγκεντρώσεις Ολικών Καροτενοειδών στα Pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	61
Διάγραμμα 9. Συγκεντρώσεις χλωροφυλλών α,β και γ των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	62
Διάγραμμα 10. Συγκεντρώσεις χλωροφυλλών α, β και γ των pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	63
Διάγραμμα 11. Συγκεντρώσεις β-καροτενίου των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	63
Διάγραμμα 12. Συγκεντρώσεις β-καροτενίου των pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	64
Διάγραμμα 13. Συγκεντρώσεις φυκοκυανίνης των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	65
Διάγραμμα 14. Συγκεντρώσεις φυκοκυανίνης των pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	66
Διάγραμμα 15. Αντιοξειδωτική Δράση των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	66
Διάγραμμα 16. Αντιοξειδωτική Δράση των pellet της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i> ...	67
Διάγραμμα 17. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α, του β-καροτενίου και της φυκοκυανίνης από τα εκχυλίσματα της υγρής και ξηρής <i>Spirulina Platensis</i>	69
Διάγραμμα 18. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών στα διάφορα είδη βιομάζας της <i>Chlorella Vulgaris</i>	74
Διάγραμμα 19. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α,β και γ στα διάφορα είδη βιομάζας της <i>Chlorella Vulgaris</i>	75
Διάγραμμα 20. Συγκέντρωση β-καροτενίου στα διάφορα είδη βιομάζας της <i>Chlorella Vulgaris</i>	76
Διάγραμμα 21. Ανάκτηση ολικών καροτενοειδών, χλωροφύλλης α και β-καροτενίου στα διάφορα είδη βιομάζας της <i>Chlorella Vulgaris</i>	77
Διάγραμμα 22. Αποδόσεις των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	78
Διάγραμμα 23. Αποδόσεις των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	79

Διάγραμμα 24. Συγκέντρωση Ολικών Καροτενοειδών των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	80
Διάγραμμα 25. Συγκέντρωση Ολικών Καροτενοειδών των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	81
Διάγραμμα 26. Συγκέντρωση Χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	82
Διάγραμμα 27. Συγκέντρωση Χλωροφυλλών α, β και γ των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	83
Διάγραμμα 28. Συγκέντρωση β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	83
Διάγραμμα 29. Συγκέντρωση β-καροτενίου των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	84
Διάγραμμα 30. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	85
Διάγραμμα 31. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	86
Διάγραμμα 32. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της υγρής <i>Chlorella Vulgaris</i>	87
Διάγραμμα 33. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της λυοφιλιωμένης <i>Chlorella Vulgaris</i>	87
Διάγραμμα 34. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της επαγωγικής <i>Chlorella Vulgaris</i>	88
Διάγραμμα 35. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών των Εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	94
Διάγραμμα 36. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών των pellet του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	95
Διάγραμμα 37. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	96
Διάγραμμα 38. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α, β και γ των pellet του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	96
Διάγραμμα 39. Συγκέντρωση ασταξανθίνης των Εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	97
Διάγραμμα 40. Συγκέντρωση ασταξανθίνης των pellet του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	98
Διάγραμμα 41. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	98
Διάγραμμα 42. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	99
Διάγραμμα 43. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και της ασταξανθίνης των Εκχυλισμάτων του <i>Haematococcus Pluvialis</i>	100
Διάγραμμα 44. Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών Εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	105
Διάγραμμα 45. Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών pellet του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	106
Διάγραμμα 46. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	107
Διάγραμμα 47. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α, β και γ των pellet του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	107
Διάγραμμα 48. Συγκέντρωση β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	108

Διάγραμμα 49. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α ,β και γ των pellet του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	108
Διάγραμμα 50. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	109
Διάγραμμα 51. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	109
Διάγραμμα 52. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων του <i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	111

Κεφάλαιο 1. Μικροφύκη

1.1.Είδη Μικροφυκών

Τα φύκη (λατινικά *alga*, πλ. *algae*) είναι μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Αναγνωρίζονται ως μια από τις παλαιότερες μορφές ζωής. Είναι πρωτόγονα φυτά (*thallophytes*) χωρίς ρίζες, φύλλα ή μίσχους και ως βασική χρωστική ουσία έχουν την χλωροφύλλη α (*chlorophyll a*) (Brennan & Owende 2010). Ο όρος «φύκη» περιλαμβάνει δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες:

- τα μακροφύκη (*macroalgae* ή κοινώς *seaweeds*), συνήθως θαλάσσια είδη
- τα μικροφύκη (*microalgae*)

Το κριτήριο της διάκρισης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών είναι μόνο το μέγεθος. Τα μακροφύκη έχουν μήκος μερικών εκατοστών, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και πολλά μέτρα (50-70) όπως στα γιγάντια Φαιοφύκη (καφέ φύκη, *kelp*). Τουναντίον, τα μικροφύκη έχουν μήκος από μερικά μικρόμετρα (συνήθως 0.2-50 μm τα μονοκύτταρα μέχρι 100-200 μm στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων σχηματισμών, όπως το κυανοβακτήριο *Spirulina Platensis*) έως κάποιες εκατοντάδες μικρόμετρα (έως και 1-2.000 μm σε ορισμένα διάτομα).

Στην τρέχουσα ταξινόμησή τους στον όρο «φύκη» συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι O₂-γόνοι φωτοσυνθέτοντες, ευκαρυωτικοί και προκαρυωτικοί οργανισμοί, εξαιρουμένων όμως των ανώτερων φυτών (Barsanti & Gualtieri 2006)

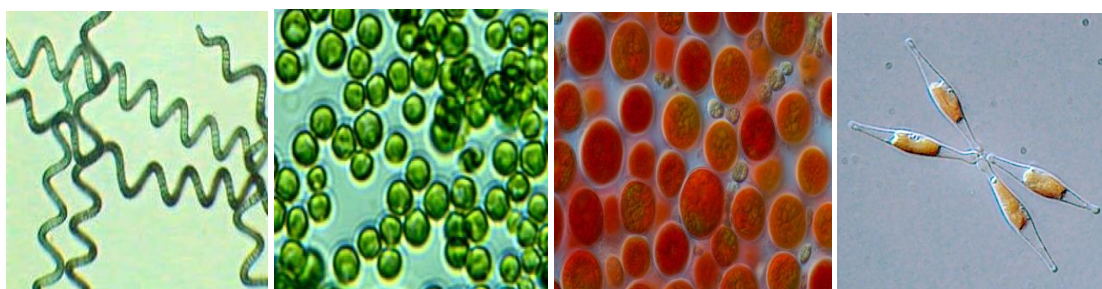
Τα προκαρυωτικά κύτταρα (κυανοβακτήρια) στερούνται σχηματισμένου πυρήνα, μεμβρανικού σχηματισμού, πέρα από την κυτταρική μεμβράνη, και οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, τα πλαστίδια, τα όργανα Golgi και τα μαστίγια. Έτσι, μοιάζουν περισσότερο με βακτήρια παρά με φύκη. Τα κυανοβακτήρια, στα οποία ανήκει και η *Spirulina Platensis*, παρόλο που είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, σε αρκετές περιπτώσεις θεωρούνται ότι ανήκουν στα μικροφύκη επειδή είναι φωτοσυνθέτοντες οργανισμοί. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, από τα οποία αποτελούνται πολλοί τύποι γνωστών φυκών, έχουν τα οργανίδια που ελέγχουν τις λειτουργίες του κυττάρου, επιτρέποντάς του να επιβιώνει και να αναπαράγεται. Τα ευκαρυωτικά φύκη κατηγοριοποιούνται σε πολλές κλάσεις που ορίζονται από τον χρωματισμό, τον κύκλο ζωής και την βασική κυτταρική δομή. Η βιολογία, η φυσιολογία και η οικολογία των μικροφυκών διαφέρουν ανάλογα με την ταξινόμηση του μικροφύκου (Barsanti & Gualtieri 2006).

Στην παρούσα εργασία, τα φύκη που μελετήθηκαν είναι: η *Spirulina Platensis*, η

Chlorella Vulgaris, ο *Haematococcus Pluvialis* και το διάτομο *Phaeodactylum Tricornutum*. Η ταξινόμηση, δηλαδή το βασίλειο, η φυλή, η κλάση, η τάξη, η οικογένεια, το γένος και το είδος, των τεσσάρων φυκών που μελετήθηκαν, παρουσιάζεται στον Πίνακα 1, ενώ στην Εικόνα 1 υπάρχει η αναπαράστασή τους.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των τεσσάρων φυκών που μελετήθηκαν

	Βασίλειο (Kingdom)	Φυλή (Phylum)	Κλάση (Class)	Τάξη (Order)	Οικογένεια (Family)	Γένος (Genus)	Είδος (Species)
Προκαρυωτικά	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanophyceae	Oscillatoriales	Phormidiaceae	Spirulina	<i>Spirulina Platensis</i>
Ευκαρυωτικά	Viridiplantae	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella Vulgaris</i>
	Viridiplantae	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomadales	Haematococcaceae	Haematococcus	<i>Haematococcus Pluvialis</i>
	Chromalveolata	Heterokontophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Phaeodactylaceae	Phaeodactylum	<i>Phaeodactylum Tricornutum</i>



Εικόνα 1. Αναπαράσταση των φυκών: α. *Spirulina Platensis*, β. *Chlorella Vulgaris*, γ. *Haematococcus pluvialis* και δ. *Phaeodactylum tricornutum*

Επίσημα έχουν καταγραφεί πάνω από 120.000 είδη, αλλά ο πραγματικός αριθμός τους είναι κατά πολύ μεγαλύτερος.

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν κοκκοειδείς, μαστιγωτές, ή παλμελοειδείς μορφές και τριχώματα αλλά και μεγάλους αποικιακούς σχηματισμούς με νήματα, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις. Μαζί με τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, το φυτοπλαγκτό και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (είτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski & Owens 1980; Reynolds 2006), καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα όπως οι θερμοπηγές ή οι παγετώνες. Εν ολίγοις αποτελούν την βάση διατροφής για το 70 % της γήινης παραγωγής βιομάζας, ενώ ευθύνονται περίπου για το 50% της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (Jassby 1988) και έχει ευρέως τεκμηριωθεί στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (Guedes & Malcata 2012).

Η εναγώνια αναζήτηση νέων υλικών και πρώτων υλών για την βιομηχανία οδήγησε στην ανάπτυξη της λεγόμενης μπλε βιοτεχνολογίας εστιάζοντας στους υδρόβιους μικροοργανισμούς (Bongiorni & Pietra 1996). Από την άλλη πλευρά, η έντονη

συζήτηση που διεξήγετο για την αντιμετώπιση των συνεπειών του υπερπληθυσμού και την πίεση που αυτός ασκεί στους διαθέσιμους πόρους τις προηγούμενες δεκαετίες (Greep 1998), οδήγησε πολλούς στην διερεύνηση της πιθανής καταφυγής και στα μικροφύκη είτε ως διατροφική λύση με παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Kuhad et al. 1997), είτε ως ανάκτηση του ρυπασμένου νερού, επαναφέροντας στο προσκήνιο και την πρόταση χρήσης τους στην αξιοποίηση άγονων εκτάσεων, ιδίως με εξαλμυρισμένους υδροφόρους ορίζοντες για διάφορα προϊόντα (Isichei 1990). Όλη αυτή η συζήτηση κινητοποίησε θεαματικά πόρους και επιστημονικές ομάδες στην δεκαετία του 2000 στην κατεύθυνση της αξιοποίησης μικροφυκών με πολλές προοπτικές για τις επόμενες δεκαετίες (Spolaore et al. 2006; Mata et al. 2010).

1.2.Χημική Σύσταση των Μικροφυκών

Μια γενική ανασκόπηση των κυριότερων συστατικών ορισμένων ειδών μικροφυκών, σε σχέση με διάφορα τρόφιμα, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. (Spolaore et al. 2006).

Πίνακας 2. Γενική Σύνθεση διάφορων τροφίμων και φυκών (% ξηρής μάζας)

Αγαθά	Πρωτεΐνες	Υδατάνθρακες	Λιπίδια
Μαγιά	39	38	1
Κρέας	43	1	34
Γάλα	26	38	28
Ρύζι	8	77	2
Σόγια (καρπός)	37	30	20
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella Vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Η υψηλή περιεκτικότητα των διάφορων ειδών μικροφυκών σε πρωτεΐνη είναι ένας από τους κύριους λόγους που τα καθιστούν σπουδαίες πηγές πρωτεϊνών, και καθώς τα μικροφύκη είναι ικανά να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα, μπορούν επίσης, να αποτελέσουν μια πηγή των σημαντικότερων εξ' αυτών. Επίσης, η μέση ποιότητα των πρωτεϊνών των περισσότερων εξετασμένων φυκών είναι ίση, ή και ανώτερη μερικές φορές από τις πρωτεΐνες των συμβατικών φυτών (Becker 2007; Konač et al. 2013). Για παράδειγμα, η ξηρή βιομάζα της Σπιρουλίνας περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και περίπου το 68% αυτής αποτελείται από πρωτεΐνες, περιεκτικότητα δηλαδή τριπλάσια σε σχέση με αυτή του βόειου κρέατος. Άλλο ένα μικροφύκος, η Χλωρέλλα, περιέχει περίπου 50-60% πρωτεΐνες, η ποιότητα των οποίων είναι συγκρίσιμη με τις αντίστοιχες των ζυμομύκητων, του αλευριού σόγιας και της σκόνης γάλακτος. Ο Milonapovic και άλλοι (2012) ερεύνησαν το περιεχόμενο της ξηρής βιομάζας διάφορων στελεχών κυανοβακτηρίων από την Σερβία σε πρωτεΐνες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα στελέχη είχαν πολύ υψηλές τιμές που κυμαίνονταν από 42,8% σε 76,5% περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Konač et al. 2013).

Τα φύκη έχουν, επίσης, υψηλή περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες όπως άγαρ, αλγινικά άλατα και καρραγενάνες. Τα παραπάνω αποτελούν και τα πιο σημαντικά προϊόντα από φύκη, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως πηκτικοί ή παράγοντες πάχυνσης σε μαρμελάδες, παγωτά και ζελέ. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες τονώνουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και έχουν αντική δράση (Konač et al. 2013).

Εκτός από τα φύκη που αναφέρονται παραπάνω, λίγα μόνο έχουν επιλεγεί για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας, όπως τα χλωροφύκη *Chlorella* και *Scenedesmus obliquus* και το κυανοβακτήριο *Spirulina*.

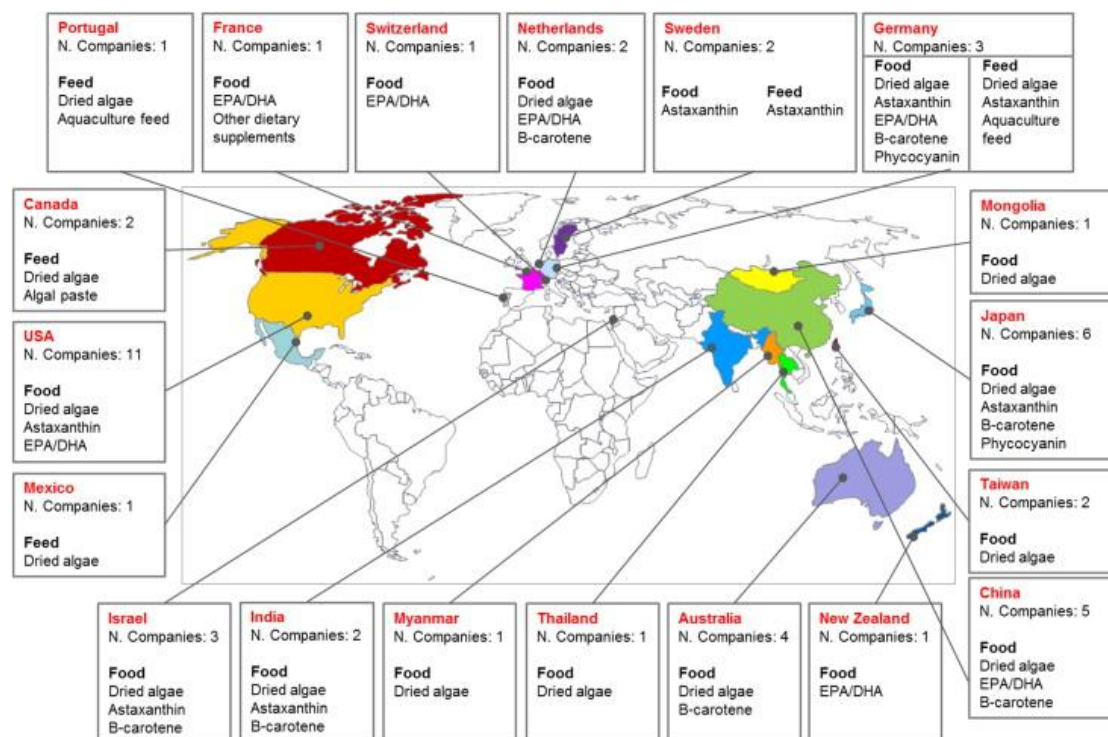
1.3. Εφαρμογές και χρήσεις μικροφυκών

Οι θαλάσσιοι πόροι αυξάνουν τις προσδοκίες στο πλαίσιο της βιοοικονομίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης και τα μικροφύκη αποτελούν μια ιδιαίτερα ελκυστική πηγή ποικίλων μορίων υψηλής αξίας για διαφορές χρήσεις (Vigani et al. 2015). Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο, κυρίως ως ζωντανή τροφή στις υδατοκαλλιέργειες αλλά και για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας και αφορούν προϊόντα τροφής, κοσμετολογίας, φαρμακευτικής χρήσης, και γενικά βιομηχανικής χρήσης. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας ως τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής με υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκού οξέος-EPA, δοκοσαεξαενοϊκού οξέως-DHA, γ- λινολενικού οξέος-GLA), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων και άλλων. Η παραγωγή αυτών των προϊόντων έχει εφαρμογή στην ανθρώπινη διατροφή, στην διατροφή ζώων, ψαριών και αλλού. Πολλοί από τους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ισοστατική δράση. Τα κυριότερα στελέχη που καλλιεργούνται ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Spirulina*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan & Owende 2010; Pulz & Gross 2004). Οι βιομηχανίες χημικών, φαρμάκων, καλλυντικών και ενέργειας διερευνούν τις δυνατότητες των μικροφυκών, αλλά ο τομέας των τροφίμων, είναι αυτός που ενδεχομένως επωφελείται περισσότερο από την τεχνολογία μικροφυκών (Vigani et al. 2015; Pulz & Gross 2004).

1.3.1. Εφαρμογές στα Τρόφιμα και Ζωοτροφές

Τα φύκη έχουν αξιοποιηθεί, εδώ και αιώνες, ως τρόφιμα και ζωοτροφές. Ήδη από τη δεκαετία του 1950, ο Burlew (1953) πρότεινε τη χρήση των φυκών ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών για την αντιμετώπιση της παγκόσμιας ζήτησης τροφίμων. Στην δεκαετία του 1960, η Ιαπωνία άρχισε την πρώτη παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα των ειδών Χλωρέλλα (*Chlorella*) για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Από το 1980, εγκαταστάσεις μεγάλης κλίμακας παραγωγής φυκών ιδρύθηκαν στην Ασία, την Ινδία, τις ΗΠΑ, το Ισραήλ και την Αυστραλία (Vigani et al. 2015). Πρόσφατες τεχνικές βελτιώσεις και εξελίξεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας μικροφυκών απέδειξαν ότι τα μικροφύκη αποτελούν μια αξιοσημειωτή πηγή διαφόρων θρεπτικών συστατικών τροφίμων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων, χάρη στις ποικίλες ενώσεις που έχουν με ευεργετικές ιδιότητες. Η υψηλή

περιεκτικότητα των ελαίων τους σε πρωτεΐνες και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) τα καθιστούν κατάλληλη τροφή, ιδιαίτερα για παιδιά, εγκύους, χορτοφάγους και ασθενείς με αλλεργίες στα ψάρια. Εφόσον, τα φύκη αποτελούν, επίσης, μια σημαντική πηγή βιταμινών, μετάλλων, αντιοξειδωτικών και φυσικών χρωστικών, η ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα και ζωοτροφές μπορεί να αυξήσει την θρεπτική αξία, να παρέχει έντονο χρώμα και να βελτιώσει την υφή και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Επί πρόσθετα, η βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να διατεθεί σε πολλές μρφές, όπως σκόνη, δισκία, κάψουλες, υγρά και να ενσωματωθεί σε προϊόντα τροφίμων (Κονατ et al. 2013). Η ενσωμάτωση της βιομάζας μικροφυκών σε παραδοσιακά φαγητά, όπως μπισκότα, ζυμαρικά και παγωτά αποτελεί έναν νέο τρόπο σχεδιασμού ελκυστικών και υγιών προϊόντων. Αυτά τα πρόσφατα επιτεύγματα έχουν ανανεώσει το ενδιαφέρον για τα μικροφύκη ως μια βιώσιμη πηγή προϊόντων τροφής και ζωοτροφής με ενισχυμένη θρεπτική ποιότητα. Τα μικροφύκη έχουν την δυνατότητα να προμηθεύσουν ένα σημαντικό τμήμα της αγοράς των τροφίμων και των ζωοτροφών όχι μόνο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αλλά και παγκοσμίως, καθώς η απαιτούμενη χρήση γης κατά την καλλιέργεια είναι ιδιαίτερος περιορισμένη και δεδομένου της τεράστιας απόδοσης ανα εκτάριο αποτελεί λύση στο πρόβλημα της παγκόσμιας διατροφικής ασφάλειας. Η γεωγραφική κατανομή των μεγαλύτερων ιδιωτικών εταιριών που παράγουν εμπορικά προϊόντα τροφίμων και ζωοτροφής από μικροφύκη παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, ενώ στον Πίνακα 3 υπάρχει ανασκόπηση των δεδομένων της αγοράς για τα τρόφιμα, ζωοτροφές και θρεπτικά από μικροφύκη. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το μερίδιο της ευρωπαϊκής παραγωγής εκτιμάται περίπου στο 5% της παγκόσμιας (Vigani et al. 2015), ενώ η Γαλλία είναι η πρώτη χώρα που καθιέρωσε ειδικό κανονισμό που αφορά την χρήση των φυκών στην ανθρώπινη κατανάλωση (Mabeau & Fleurence 1993).



Εικόνα 2. Παγκόσμια κατανομή των μεγαλύτερων εταιριών που δραστηριοποιούνται στον τομέα των μικροφύκων στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές

Πίνακας 3. Στοιχεία της αγοράς των προϊόντων από μικροφύκη

Προϊόντα βασισμένα σε Μικροφύκη	Όγκος Παραγωγής (τόνοι ξηράς μάζας/χρόνο)	Αριθμός Παραγωγών	Αξία Παραγωγής (ετήσιες εισπράξεις σε εκ. US \$)	Αξία Παραγωγής εναλλακτικών πηγών (ετήσιες εισπράξεις σε εκατ. US \$)
Ολικώς ξηρά Μικροφύκη				
<i>Σπιρουλίνα</i>	5000 (2012)	15	40 (2005)	Καμία Εναλλακτική
<i>Χλωρέλλα</i>	2000 (2003)	70	38 (2006)	Καμία Εναλλακτική
Μόρια υψηλής αξίας αξίας				
<i>Ασταξανθίνη</i>	300 (2004)	8	10(2004)	200 (2004)
<i>Φυκοβιλιπρωτεΐνες</i>	Δεν εφαρμόζεται	2	-	50 (2004)
<i>Ω-3 Λιπαρά Οξέα</i>	240 (2003)	4	300 (2004)	14390 (2009)
<i>β-καροτένιο</i>	1200	10	-	285 (2012)

Ορισμένα μικροφύκη έγιναν αντικείμενο εκμετάλλευσης για χιλιετίες (όπως η Σπιρουλίνα στο Μεξικό). Επί του παρόντος, έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών από τη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων μέχρι τα καλλυντικά και την παραγωγή μορίων υψηλής αξίας (π.χ., λιπαρά οξέα, χρωστικές ουσίες, Πίνακας 3). Ωστόσο, τα μικροφύκη δεν είναι ακόμα μια καλά μελετημένη ομάδα από βιοτεχνολογικής άποψης. Πράγματι, ανάμεσα στα 10.000 είδη που πιστεύεται ότι υπάρχουν, μόνο μερικές εκατοντάδες διερευνώνται για το χημικό τους περιεχόμενο και πολύ λιγότερα καλλιεργούνται σε μεγάλες βιομηχανικές ποσότητες (δηλαδή, σε τόνους ανά έτος). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας μικροφυκών έχει επιβραδυνθεί από την περιορισμένη ανάπτυξή τους στους βιομηχανικούς φωτοβιοαντιδραστήρες. Επί του παρόντος, η μεγαλύτερη παραγωγή μικροφυκών λαμβάνει χώρα σε υπαίθριες καλλιέργειες. Παρόλα αυτά, η εμπορευματοποίηση συστημάτων κλειστού τύπου έχει ξεκινήσει κυρίως με την καλλιέργεια του Αιματόκοκκου στην Ιαπωνία και το Ισραήλ, καθώς και της Χλωρέλλας στην Γερμανία. Τα συστήματα παραγωγής μικροφυκών πρέπει να βελτιωθούν περαιτέρω, ώστε να γίνουν πιο ανταγωνιστικά και οικονομικά εφικτά (Spolaore et al. 2006).

Παρά την υψηλή περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά, τα μικροφύκη δεν έχουν κερδίσει ιδιαίτερο έδαφος ως τρόφιμα ή υποκατάστατο τροφίμων και η κατανάλωσή τους είναι περιορισμένη (Becker 2007; Kovač et al. 2013). Αυτό οφείλεται κυρίως στο σκούρο πράσινο χρώμα και την οσμή ψαριού που έχουν και έτσι περιορίζεται η ενσωμάτωσή τους σε συμβατικά τρόφιμα. Πολλά πειράματα έχουν διεξαχθεί με σκοπό να τροποποιήσουν ή να συνδυάσουν τα μικροφύκη με γνωστά τρόφιμα, εφαρμόζοντας διάφορες τεχνικές, όπως η θέρμανση, το ψήσιμο και η ανάμιξη. Για παράδειγμα, έγιναν προσπάθειες να προστεθούν φύκη σε παρασκευάσματα ψωμιού ή ζυμαρικών (noodles). Ωστόσο, αυτό έγινε εφικτό μόνο με πολύ μικρές ποσότητες, πριν η εμφάνιση και η γεύση αλλάξουν τόσο, ώστε τα προϊόντα να γίνουν μη ελκυστικά. Επιπρόσθετο αξιοσημείωτο εμπόδιο είναι και οι κοινωνικο-εθνολογικές αντιλήψεις των αναπτυσσόμενων χωρών και ο συντηρητισμός ενάντι άγνωστων συστατικών τροφίμων. Τέλος, το κόστος παραγωγής μικροφυκών είναι ακόμη πολύ υψηλό για να ανταγωνιστούν τις συμβατικές πηγές

πρωτεϊνών(Becker 2007).

Πάντως τα πιο σημαντικά φύκη στον τομέα των τροφίμων είναι η Σπιρουλίνα και η Χλωρέλλα, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4(Brennan & Owende 2010).

Πίνακας 4. Κατάσταση παραγωγής σημαντικότερων μικροφυκών

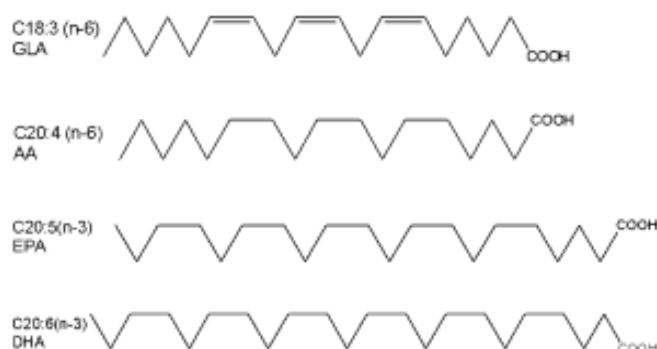
Μικροφύκη	Ετήσια Παραγωγή	Παραγωγός Χώρα	Εφαρμογή & Προϊόν	Τιμή (€)
<i>Σπιρουλίνα</i>	3000 τόνους ξηρού βάρους	Κίνα, Ινδία, ΗΠΑ, Ιαπωνία	Διατροφή του ανθρώπου	36 kg ⁻¹
			Ζωική Τροφή	
			Καλλυντικά	
			Phycobiliproteins	11 mg ⁻¹
<i>Χλωρέλλα</i>	2000 τόνους ξηρού βάρους	Ταϊβάν, Γερμανία, Ιαπωνία	Διατροφή του ανθρώπου	36 kg ⁻¹
			Καλλυντικά	
			Ιχθυοτροφεία	50 l ⁻¹
<i>Dunaliella salina</i>	1200 τόνους ξηρού βάρους	Αυστραλία, Ισραήλ, ΗΠΑ, Ιαπωνία	Διατροφή του ανθρώπου	
			Καλλυντικά	
			Β-καροτένιο	215 - 2150 kg ⁻¹
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 τόνους ξηρού βάρους	ΗΠΑ	Διατροφή του ανθρώπου	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 τόνους ξηρού βάρους	ΗΠΑ, Ινδία, Ισραήλ	Ιχθυοτροφεία	50 l ⁻¹
			Ασταξανθίνη	7150 kg ⁻¹
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 τόνους ελαίου DHA	ΗΠΑ	Έλαιο DHA	43 g ⁻¹
<i>Shizochytrium</i>	10 τόνους ελαίου DHA	ΗΠΑ	Έλαιο DHA	43 g ⁻¹

1.3.1.1. Πηγή Πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα φυτά και τα ζώα δεν διαθέτουν τα απαιτούμενα ένζυμα για να συνθέσουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) με περισσότερους από 18 άνθρακες. Έτσι, θα πρέπει να τα λαμβάνουν από την τροφή τους. Τα ψάρια και τα ιχθυέλαια είναι γνωστές πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, αλλά τα ζητήματα ασφαλείας έχουν αυξηθεί και περιορίζουν την χρήση τους για πολλούς λόγους:

1. Τα επίπεδα υδραργύρου και πολυχλωριωμένου διφαινυλίου είναι απαγορευτικά για ορισμένους καταναλωτές, όπως παιδιά και έγκυοι
2. Έχουν δυσάρεστη οσμή
3. Δεν είναι κατάλληλα για χορτοφάγους
4. Πολλά είδη ψαριών κινδυνεύουν σε εξαφάνιση λόγω της υπεραλίευσης

Επιπλέον, η εφαρμογή ιχθυελαίου ως πρόσθετο τροφίμων είναι περιορισμένη λόγω της κακής οξειδωτικής του σταθερότητας. Καθώς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα ψάρια, προέρχονται από τα μικροφύκη που καταναλώνουν, είναι επόμενο τα τελευταία να έχουν πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα και παραγωγή σε αυτά και να εξεταστούν ως πιθανές πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Sroloare et al. 2006). Ανάμεσα στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα ω-3 παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, με το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) (Εικόνα 3) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) (Εικόνα 3) να έχουν μεγάλη θρεπτική αξία. Επίσης το γ-λινολενικό οξύ (GLA) (Εικόνα 3) είναι ένα ω-6 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που βοηθά, όπως έχουν δείξει πολλές έρευνες, στην θεραπεία ασθενειών, όπως η αρθρίτιδα, η παχυσαρκία, η νόσος του Parkinson, η σκλήρυνση κατά πλάκας, οι καρδιακές νόσοι και άλλες ασθένειες (Kerby & Raven 1985).



Εικόνα 3. Οι δομές των σημαντικότερων λιπαρών οξέων

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνουν τα επίπεδα λιπιδίων (χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων) και ως εκ τούτου τον κίνδυνο καρδιακών νόσων και αθηροσκλήρωσης. Από αυτήν την άποψη τα EPA και GLA είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά (Κοναč et al. 2013). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Τα σημαντικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ΠΑΛΟ) από μικροφύκη.

Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα	Δομή	Πιθανή Εφαρμογή	Παραγωγός Μικροοργανισμός
γ-λινολεϊκό οξύ (GLA)	18:3 ω6, 9, 12	Παρασκευάσματα για βρέφη στον τελευταίο μήνα κύησης Συμπληρώματα διατροφής	Spirulina
Αραχιδονικό οξύ (AA)	20:4 ω6, 9, 12, 15	Παρασκευάσματα για βρέφη στον τελευταίο μήνα κύησης – πρόωρα βρεφη Συμπληρώματα διατροφής	Porphyridium
Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA)	20:5 ω3, 6, 9, 12, 15	Συμπληρώματα διατροφής Ιχθυοτροφεία	Nannochloropsis, Phaeodactylum, Nitzschia
Δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA)	22:6 ω3, 6, 9, 12, 15, 18	Παρασκευάσματα για βρέφη στον τελευταίο μήνα κύησης – πρόωρα βρεφη Συμπληρώματα διατροφής Ιχθυοτροφεία	Crypthecodinium, Schizochytrium

Έτσι, τα PUFAs από μικροφύκη είναι μια πολύ ελπιδοφόρα λύση για την αγορά τροφίμων και ζωοτροφών και κυρίως για την βιομηχανία βρεφικών προϊόντων. Η εταιρία Martek (ΗΠΑ) έχει αναπτύξει και κατοχυρώσει με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας δύο ζυμώσιμα στελέχη μικροφυκών που παράγουν έλαια και είναι πλούσια σε DHA. Αυτά τα έλαια προέρχονται από πηγή που δεν έχει υποστεί γενετική τροποποίηση και είναι αποδεκτά από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για χρήση σε βρεφικά παρασκευάσματα στις Η.Π.Α. (Kovač et al. 2013).

1.3.1.2. Πηγή Βιταμινών και Μετάλλων

Τα φύκη αποτελούν μια πλούσια πηγή βιταμινών και μετάλλων, κάτι που τα καθιστά κατάλληλα ως συμπληρώματα διατροφής. Πολλά είδη του γένους Χλωρέλλα (*Chlorella*) περιέχουν περισσότερες βιταμίνες από ότι η πλειψηφία των καλλιεργούμενων φυτών. Επιπλέον, το γένος Σπιρουλίνα περιέχει πάνω από δέκα φορές περισσότερο β-καροτένιο από κάθε άλλο τρόφιμο, συμπεριλαμβανομένων των καρότων (Mohammed 2011) και περισσότερη βιταμίνη B12 συγκρινόμενο με οποιοδήποτε φρέσκο φυτό ή ζωοτροφή. Σε σύγκριση με τα πράσινα φύκη, το σπανάκι και το ήπαρ, το γένος Σπιρουλίνα αποτελεί την πλουσιότερη πηγή βιταμίνης E, θειαμίνης, κοβαλαμίνης, βιοτίνης και ινοσιτόλης (Gantar & Svirčev 2008). Επίσης, διάφορα είδη μικροφυκών παράγουν α-τοκοφερόλη (η πιο βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης E) σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις.

Τα φύκη έχουν επίσης δυνατότητες ως συμπληρώματα μετάλλων στην βιομηχανία των ζωοτροφών. Πολλά βρώσιμα μακροφύκη περιέχουν υψηλότερες ποσότητες τόσο μακροθρεπτικών (8.083–17,875 mg/100g; Na, K, Ca, Mg), όσο και ιχνοστοιχείων (5.1–15.2 mg/100 g; Fe, Zn, Mn, Cu) σε σχέση με τα βρώσιμα φυτά της γης. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής και να συμβάλλουν στην κάλυψη της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης ορισμένων βασικών μετάλλων και ιχνοστοιχείων (Rupérez 2002). Ωστόσο, η βιομάζα των φυκών προσφέρει κυρίως μια συμπληρωματική πηγή παρά μια πλήρη αντικατάσταση για επεξεργασμένα μέταλλα ή βιταμίνες στις ζωοτροφές (Kovač et al. 2013).

1.3.1.3. Πηγή Αντιοξειδωτικών

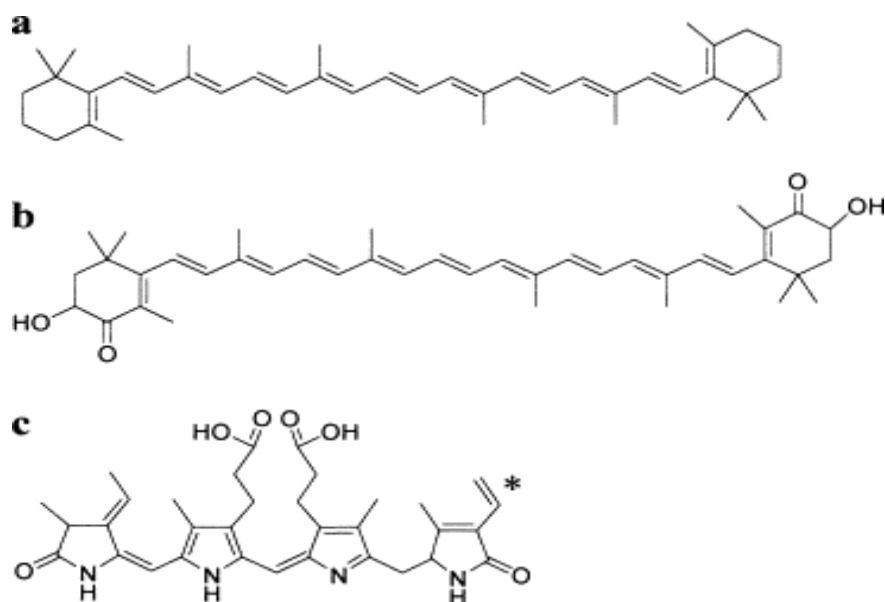
Μεταξύ των διάφορων ενώσεων και συστατικών με ευεργετικές ιδιότητες, τα αντιοξειδωτικά ανήκουν στις ευρέως μελετηθείσες ενώσεις μεγάλου ενδιαφέροντος. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία τροφίμων, λόγω της χρησιμότητάς τους έναντι στην υπεροξείδωση λιπιδίων. Επιπλέον, ο σημαντικός ρόλος των αντιοξειδωτικών στην υγεία έχει αποδειχθεί, αυξάνοντας έτσι το ενδιαφέρον των εν λόγω προϊόντων και την ζήτηση τους από τους καταναλωτές (Herrero et al. 2006). Τα πιο ισχυρά υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στα φύκη είναι οι πολυφαινόλες, οι φυκομπιλίνες και οι βιταμίνες. Ώντας φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, τα φύκη είναι εκτεθειμένα στο φως και σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, καθώς και σε καλλιέργειες με υψηλή πυκνότητα κυττάρων στους κλειστούς βιοαντιδραστήρες. Τέτοιες συνθήκες προωθούν την συσσώρευση ιδιαίτερα αποτελεσματικών αντιοξειδωτικών συμπλόκων που προστατεύουν τα κύτταρα. Παραδείγματος χάρη, η *Spirulina Platensis* μπορεί να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητά της κατά 2,3 φορές σε ακραίες συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Kovač et al. 2013).

1.3.1.4. Πηγή Φυσικών Χρωστικών

Τα συνθετικά χρώματα που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων είναι κυρίως παράγωγα λιθανθρακόπισσας (coal tar) και παρόλο που έχουν απαγορευθεί σε πολλές χώρες λόγω των κινδύνων για την υγεία, προτιμούνται, καθώς τα φυσικά χρώματα από φυτικές πηγές έχουν πολύ χαμηλή απόδοση. Δεδομένου ότι η παγκόσμια τάση για χρωστικές είναι η αντικατάσταση των τεχνητών με φυσικές και η εκχύλιση χρωστικών από φυτά απαιτεί μεγάλα ποσά βιομάζας, τα φύκη αποτελούν μια σπουδαία εναλλακτική. Εκτός από τις χλωροφύλλες που περιέχονται στα φύκη, μπορούν να βρεθούν και άλλοι τύποι χρωστικών, όπως τα καροτενοειδή και οι φυκομπιλίνες (Konač et al. 2013).

1.3.1.4.1. Καροτενοειδή

Ανάμεσα σε παραπάνω από 400 καροτενοειδή, μόνο λίγα χρησιμοποιούνται εμπορικά: το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη (Εικόνα 4α,4β), ενώ λιγότερης σημασίας είναι η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, το λυκοπένιο και η μπιξίνη. Οι σημαντικότερες εφαρμογές τους είναι ως φυσικές χρωστικές τροφίμων (χυμοί πορτοκαλιού), όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ως πρόσθετα για ζωοτροφές (ψάρια, πουλερικά), ως συμπληρώματα βιταμινών, καθώς και στον τομέα των καλλυντικών. Τα καροτενοειδή έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες λόγω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες δημιουργώντας μια χημική προστασία ενάντια στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, σε έρευνες *in vitro* και *in vivo* σε ανθρώπους και ψάρια δεν έχουν δείξει αντικαρκινικές δράσεις. Η σύγκριση μεταξύ των δύο πιο εμπορικών καροτενοειδών, β-καροτένιο και ασταξανθίνη, παρουσιάζεται στον Πίνακα 6 (Spolaore et al. 2006).



Εικόνα 4. Χημικές δομές των χρωστικών ουσιών μικροφυκών: (α) β-καροτένιο, (β) ασταξανθίνη, (γ) φυκοερυθρίνης (στην φυκοκυανίνη, ο δεσμός CH = CH₂ που σημειώνεται με αστερίσκο αντικαθίσταται από τον δεσμό CH₃-CH₂)

Πίνακας 6. Σύγκριση μεταξύ των καροτενοειδών: β-καροτενίου και ασταξανθίνης (Spolaore et al. 2006)

Μόριο	Προέλευση	Ισομερές	Αγορά	Τιμή (US \$)	Κύριος Πραγωγός
β-καροτένιο	Dunaliella Spirulina	Όλα τα trans και 9-cis		300 – 3000 kg ⁻¹	Cognis Nutrition and Health (Hutt Lagoon and Whyalla, Αυστραλία), Cyanotech (Kona, Χαβάη, ΗΠΑ), Inner Mongolia Biological Eng. (Inner Mongolia, Κίνα), Nature Beta Technologies (Eilat, Ισραήλ), Tianjin Lantai Biotechnology (Tianjin, Κίνα)
	Συνθετική	Όλα τα trans 3S, 3'S	>90%		
Ασταξανθίνη	Haematococcus				Cyanotech (Kona, Χαβάη, ΗΠΑ), Mera Pharmaceuticals (Kailua-Kona, Χαβάη, ΗΠΑ), Bioreal (Kihei, Χαβάη, ΗΠΑ), Parrys's Pharmaceuticals (Chennai, Ινδία), Algatech (Kibbutz, Ketura, Ισραήλ)
	Συνθετική	3S, 3'S-, 3R, 3'R, -3R, 3'S (meso)	>95%	~ 2500 kg ⁻¹	Hoffman-La Roche (Βασιλεία, Ελβετία) και BASF (Ludwigshafen, Γερμανία)

Το πιο σημαντικό καροτενοειδές είναι το β-καροτένιο χάρη στην δράση του ως προβιταμίνη Α. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Το β-καροτένιο χρησιμοποιείται ως χρωστική, προβιταμίνη και πρόσθετο για πολυβιταμινούχα σκευάσματα. Η φυσική μορφή αυτής της χρωστικής έχει ισχυρότερη επίδραση από ότι η αντίστοιχη συνθετική και απορροφάται αρκετές φορές πιο εύκολα από το σώμα. Πλούσιες πηγές β-καροτενίου είναι η Σπιρουλίνα (*Spirulina*) και το μικροφύκος *Dunaliella salina* (Spolaore et al. 2006).

Πολλές ενδείξεις αναφέρουν πως η ασταξανθίνη ξεπερνά τα αντιοξειδωτικά οφέλη του β-καροτενίου. Αν και η φυσική της μορφή δεν μπορεί να ανταγωνιστεί εμπορικά την συνθετική, λόγω της τιμής της, η ασταξανθίνη προτιμάται για συγκεκριμένες εφαρμογές, όπως η διατροφή πουλερικών, τσιπούρων και κυπρίνων. Το μικροφύκος *Haematococcus Pluvialis* αποτελεί μια πλούσια πηγή της, όπως γίνεται φανερό και από τον Πίνακα 6 (Spolaore et al. 2006). Η εταιρία Fraunhofer IGB (Γερμανία) επικεντρώνει τις δραστηριότητές της στον τομέα των συμπληρωμάτων διατροφής, συμπεριλαμβάνοντας φυσική ασταξανθίνη που προέρχεται από το παραπάνω μικροφύκος (Konač et al. 2013).

1.3.1.4.2. Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες είναι φυσικές χρωστικές που υπάρχουν στα φωτοσυνθετικά φυτά, όπως τα φύκη, και σε μερικά φωτοσυνθετικά βακτήρια, όπως τα κυανοβακτήρια. Πάίζουν καθοριστικό ρόλο στην φωτοσύνθεση. Χρησιμοποιούνται ως φυσικές χρωστικές για τρόφιμα και ποτά, αλλά και στην βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων. Οι χλωροφύλλες μπορούν να «επισκευάσουν» τα κύτταρα, αυξάνουν την αιμοσφαιρίνη και επιταχύνουν την κυτταρική ανάπτυξη (Rangel-Yagui et al. 2004).

Οι σημαντικότερες χλωροφύλλες στον τομέα των τροφίμων είναι η α και β χλωροφύλλη. Η χλωροφύλλη α, λόγω της σταθερότητάς της, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως χρωστική. Αυτή η ουσία παράγεται συμβατικά από φυτά. Ως εκ τούτου, απαιτούνται κατάλληλες διεργασίες εκχύλισης και διαχωρισμού. Στην Βραζιλία, η χλωροφύλλη που χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική λαμβάνεται από το σπανάκι με περιεκτικότητα περίπου 0,06 mg/g. Αντίθετα, τα μικροφύκη, όπως η *Spirulina Platensis*, παρουσιάζουν πολύ υψηλά περιεχόμενα σε χλωροφύλλη α, που αντιστοιχεί στο 1,15% της βιομάζας τους. Με βάση αυτό το γεγονός, αλλά και την ζήτηση των καταναλωτών για φυσικές χρωστικές, η χρήση των μικροφυκών για παραγωγή χλωροφυλλών είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική, γιατί εκτός από πράσινο χρώμα, η ενσωμάτωση των μικροφυκών στα τρόφιμα αυξάνει και την θρεπτική τους αξία (Danesi et al. 2004).

1.3.1.4.3. Φυκομπιλίνες

Οι φυκομπιλίνες είναι μια ομάδα χρωστικών με μεγάλη εμπορική αξία. Εκτός από την χρήση τους ως φυσικές χρωστικές ουσίες, υπάρχουν ενδείξεις για πολλές ιδιότητές τους που βελτιώνουν την υγεία και έτσι μπορούν να έχουν ευρείες φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι κύριοι εμπορικοί παραγωγοί φυκομπιλιπρωτεϊνών (δηλαδή η φυκοερυθρίνη και η φυκοκυανίνη, Εικ. 4γ) είναι το κυανοβακτήριο *Arthrospira* και το *Porphyridium* (Spolaore et al. 2006). Η φυκοκυανίνη είναι μια από τις πιο υποσχόμενες εμπορικές ουσίες στην Σπιρουλίνα. Η εταιρία Dainippon Ink & Chemicals (Ιαπωνία) έχει αναπτύξει μια φυσική χρωστική με την ονομασία Lina-blue, η οποία χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα διατροφής σε Κίνα και Ιαπωνία, όπως τσίχλες, καραμέλες, γαλακτοκομικά προϊόντα, ζελέ και αναψυκτικά. Πωλεί επίσης μια άλλη μορφή της χρωστικής αυτής για φυσικά καλλυντικά, όπως κραγιόν. Επί πρόσθετα, έχει αποδειχθεί πως η φυκοκυανίνη έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες και φαίνεται να είναι ένα πιθανό χημειοθεραπευτικό και υποχοληστερολαιμικό μέσο (Kovač et al. 2013; Spolaore et al. 2006).

Γενικά, οι χρωστικές ουσίες των μικροφυκών, καθώς και το σύνολο της βιομάζας τους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χρωματίσει τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και να βελτιώσει την υφή τους. Έχει αποδειχθεί πως η φυκοκυανίνη βελτιώνει σημαντικά τις ρεολογικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων, οι οποίες αυξάνονται γραμμικά με την συγκέντρωσή της. Από την άλλη, χάρη στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυσικών χρωστικών, είναι δυνατό να βελτιωθεί η αντίσταση στην οξείδωση των λιπιδίων, κάτι που είναι ιδιαίτερα θετικό για προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, όπως τα γαλακτώματα. Η ενσωμάτωση της βιομάζας μικροφυκών σε γαλακτώματα είχε ως αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων, από πράσινο σε πορτοκαλί και ροζ, και ταυτόχρονα την ενίσχυση της αντοχής σε οξείδωση. Ερευνητές σύγκριναν επίσης τις επιδράσεις της βιομάζας του *Haematococcus Pluvialis* και της *Chlorella Vulgaris* και κατέληξαν στο ότι η υψηλότερη οξειδωτική σταθερότητα του πρώτου οφείλεται στην ασταξανθίνη (Kovač et al. 2013).

1.3.1.5. Τα φύκη ως συστατικό «λειτουργικών» τροφίμων (functional food)

Στις ανεπτυγμένες χώρες, η διατροφή των ανθρώπων παρέχει πολλές θερμίδες και σε συνδιασμό με τον σύγχρονο τρόπο ζωής, μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας, όπως παχυσαρκία, καρδιακές παθήσεις, διαβήτη και άλλες ασθένειες.

Επομένως, είναι αναγκαία τρόφιμα που προωθούν την υγεία, εμπλουτίζοντας την διατροφή με βιταμίνες, μέταλλα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και άλλα θρεπτικά συστατικά (Konač et al. 2013). Έτσι, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα λεγόμενα «λειτουργικά» τρόφιμα, καθώς μπορούν να παρέχουν ποικίλα οφέλη, όπως αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη και αντιυπερτασιακά συστατικά. Ένα λειτουργικό τρόφιμο μπορεί να οριστεί ως ένα τρόφιμο που έχει ευεργετική επίδραση στην υγεία και μειώνει τον κίνδυνο ασθενειών. Επιπλέον, νέα είδη προϊόντων, που προέρχονται από τα τρόφιμα, τα λεγόμενα «φαρμακοτρόφιμα» (nutraceuticals) έχουν αναπτυχθεί αρκετά και διατίθενται ως συμπληρώματα διατροφής, με την μορφή δισκίων και χαπιών, με σημαντικά οφέλη για την υγεία. Τα «λειτουργικά» τρόφιμα λαμβάνονται από τα αντίστοιχα παραδοσιακά εμπλουτισμένα με ένα συστατικό που βελτιώνει την υγεία και λέγεται «λειτουργικό» συστατικό (Herrero et al. 2006). Μάλιστα, σύμφωνα με τους καταναλωτές, η χρήση συστατικών που λαμβάνονται από φυσικές πηγές, όπως τα φυτά, τα φύκη και τα μικροφύκη προτιμάται και είναι πιο ελκυστική αντί των αντίστοιχων συνθετικών (Konač et al. 2013). Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, τα μικροφύκη λαμβάνουν μεγάλη προσοχή, χάρη στο περιεχόμενό τους σε λειτουργικά συστατικά, όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, β-καροτένιο και άλλες χρωστικές (αντιοξειδωτικά) (Herrero et al. 2006). Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στα φύκη έχει αναφερθεί παραπάνω, όμως πολλές έρευνες επικεντρώνονται και στην υποχοληστερολαιμική δράση που αποδίδεται σε διάφορες ουσίες, όπως η δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, της χλωροφύλλης και της φυκοκυανίνης. Σε μια ομάδα ποντικών που τροφοδοτήθηκε ένα μίγμα διάφορων φυκών, φάνηκε ότι τα επίπεδα χοληστερόλης μειώθηκαν κατά 49,7% κάτι που συνδέθηκε με την παρουσία πολυσακχαριτών. Ενώ, όταν η διατροφή κοτόπουλων εμπλουτίστηκε κατά 10% με βιομάζα του μικροφύκου *Porphyridium* sp., μειώθηκαν τα επίπεδα χοληστερόλης τους κατά 28% και τα επίπεδα χοληστερόλης των κρόκων αυγών κατά 10%. Επιπλέον το χρώμα του κρόκου αυγού έγινε πιο σκούρο, λόγω των υψηλότερων επιπέδων καροτενοειδών και το λινελαϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ αυξήθηκαν κατά 29% και 24% αντίστοιχα (Konač et al. 2013).

1.3.1.6. Τα φύκη στην διατροφή των ζώων

Εκτός από τη χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή, τα μικροφύκη μπορούν να ενσωματωθούν στις ζωοτροφές για μια ευρεία ποικιλία ζώων, από ψάρια (υδατοκαλλιέργειες) έως κατοικίδια και ζώα αγροκτήματος. Στην πραγματικότητα, το 30% της τρέχουσας παγκόσμιας παραγωγής φυκών διατίθεται για ζωοτροφές και πάνω από το 50% της παγκόσμιας παραγωγής του γένους *Spirulina* χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα ζωοτροφής.

1.3.1.6.1. Υδατοκαλλιέργειες

Η παγκόσμια αγορά για τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας, όπως τα ψάρια και τα οστρακοειδή κυμαίνεται περίπου στα 40–50×109\$/τον χρόνο για τις Η.Π.Α. με μια αυξανόμενη τάση (8% ετησίως), ειδικά στις περιοχές του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ασίας. Το 1999, η παραγωγή των μικροφυκών για υδατοκαλλιέργειες έφτασε τους 1000 τόνους (62% για τα μαλάκια, 21% για τις γαρίδες, και 16% για τα ψάρια). Η σημασία των φυκών στον τομέα αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, δεδομένου ότι αποτελούν φυσική πηγή τροφής των ζώων αυτών. Τα φύκη χρησιμοποιούνται νωπά

(ως μοναδικά συστατικά ή ως πρόσθετα τροφίμων) για τον χρωματισμό της σάρκας σολομών και για άλλες βιολογικές δραστηριότητες.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη είναι: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis* και *Thalassiosira*. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε υδατοκαλλιέργειες, τα μικροφύκη πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια. Αρχικά, πρέπει να είναι εύκολα καλλιεργήσιμα και μη τοξικά. Δεύτερον, πρέπει να έχουν σωστό μέγεθος και σχήμα, ώστε να μπορούν να καταποθούν, και υψηλή θρεπτική ποιότητα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την διατροφική αξία των μικροφυκών. Επιπλέον, το υψηλό περιεχόμενο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (εικοσαπεντανοϊκό οξύ [EPA], το αραχιδονικό οξύ [AA], και δοκοσαεξανοϊκό οξύ [DHA]) είναι μείζονος σημασίας. Τέλος, το περιεχόμενό τους σε βιταμίνες πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη.

Εκτός από πηγή τροφής για τα ζωοπλαγκτόν, τα μικροφύκη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν τα προϊόντα των υδατοκαλλιεργειών. Στην πραγματικότητα, οι τεχνητές τροφές παρουσιάζουν έλλειψη χρωστικών που δίνουν στους οργανισμούς, όπως ο σολομός και η πέστροφα, το χαρακτηριστικό χρώμα τους. Έτσι, οι χρωστικές καροτενοειδών, όπως η ασταξανθίνη, πρέπει να παρέχονται σε τέτοιες περιπτώσεις. Πράγματι, η ασταξανθίνη έχει εγκριθεί στην Ιαπωνία και τον Καναδά, ως χρωστική στις τροφές σολομών. Ζωοτροφές που περιέχουν από 5% έως 20% καροτενοειδή, ενισχύουν το κόκκινο και κίτρινο χρώμα στους κυπρίνους. Άλλο αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι η παραδοσιακή γαλλική τεχνική του πρασινίσματος των στρειδιών με το διάτομο *Haslea ostrearia*, που αυξάνει την αξία του προϊόντος κατά 40%.

Παρά τα πλεονεκτήματα των ζωντανών μικροφυκών στην υδατοκαλλιέργεια, όμως, η σημερινή τάση είναι να αποφεύγεται η χρήση τους. Αυτό οφείλεται στο υψηλό κόστος τους και στη δυσκολία στην παραγωγή, συγκέντρωση και αποθήκευσή τους. Ως αποτέλεσμα, τα ζωντανά φύκη έχουν αντικατασταθεί μερικώς από ζυμομύκητες, διατηρούντα φύκη και άλλες πηγές.

1.3.1.6.2. Ζωοτροφές

Όσον αφορά, όμως, τις τροφές για τα ζώα αγροκτημάτων, η βιομάζα των φυκών είναι κατάλληλη για συμπλήρωμα. Η *Spirulina* χρησιμοποιείται κατά κόρον σε αυτόν τον τομέα και αφορά πολλά είδη ζώων, όπως άλογα, πτηνά, αγελάδες και κατοικίδια. Τα φύκη επηρεάζουν θετικά την φυσιολογία, βελτιώνουν την ανοσολογική απόκριση, την γονιμότητα και τον έλεγχο του βάρους. Επιπλέον, επιδρούν θετικά στην εξωτερική εμφάνιση, επιτυγχάνοντας υγιές δέρμα (Spolaore et al. 2006; Kovač et al. 2013). Η κύρια εφαρμογή τους αφορά στα πουλερικά και η ενσωμάτωσή τους στην διατροφή τους προσφέρει μια πολύ ελπιδοφόρα προοπτική (Becker 2007). Στα πουλερικά, τα φύκη σε ποσοστό 5-10% μπορούν να αντικαταστήσουν με ασφάλεια τις συμβατικές πρωτεΐνες, μεγαλύτερη, όμως, δόση έχει δυσμενείς επιπτώσεις.

Πολλές εταιρίες έχουν μετατοπίσει το ενδιαφέρον από την παραγωγή βιοντίζελ στην παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας, όπως βιομάζα πλούσια σε ω-3 και πρωτεΐνες για ζωοτροφές. Το Institut für Getreideverarbeitung (Γερμανία) παράγει μια φυσική ζωοτροφή με τα φύκη Χλωρέλλα και Σπιρουλίνα με την ονομασία «Algrow» (Spolaore et al. 2006; Kovač et al. 2013).

1.3.2. Εφαρμογές στην φαρμακευτική

Είναι γνωστό, πως πολλές ουσίες που λαμβάνονται από τα μικροφύκη, όπως τα φυκοκολλοειδή (άγαρ, καραγενάνη και αλιγινικά) έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και δεκαετίες στην ιατρική και την φαρμακολογία (Kurt, Oguz, Taskin, Ergun, Ozturk, Mehmet. Caki, Zerrin. Taskin 2010). Τα φύκη αποτελούν πλούσια πηγή βιολογικά ενεργών πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών (Schwartz et al. 1990). Αυτοί οι μεταβολίτες των μικροφυκών είναι βιοδραστικές ενώσεις μεγάλου ενδιαφέροντος γιατί είναι δύσκολο να παραχθούν με χημική σύνθεση και μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν στον τομέα της φαρμακευτικής βιομηχανίας. Τα εκχυλίσματα πολλών μικροφυκών, όπως *Chlorella Vulgaris* και *Chlamydomonas rypgenoidosa*, έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση in vitro έναντι σε βακτήρια θετικά και αρνητικά κατά Gram. Έχει, επίσης, αναφερθεί ότι μια μεγάλη ποικιλία από in vitro αντιμυκητιακές δράσεις προέρχονται από τα εκχυλίσματα πράσινων φυκών, διατόμων και δινομαστιγιωτών. Μικροφύκη, όπως *Ochromonas* sp., *Prymnesium parvum* και διάφορα άλλα μπλε-πράσινα φύκη, παράγουν τοξίνες που μπορούν δυνητικά να έχουν φαρμακευτικές εφαρμογές. Επίπρόσθετα, διάφορα στελέχη κυανοβακτηρίων είναι γνωστό ότι παράγουν ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς μεταβολίτες με αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντικρκινικές δυνατότητες. Η θερμοκρασία επώασης, το pH και ο φωτισμός της καλλιέργειας, καθώς και η περίοδος επώασης είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση (Priyadarshani & Rath 2012).

1.3.3. Εφαρμογές στην Κοσμετολογία

Ορισμένα είδη μικροφυκών έχουν καθιερωθεί στην αγορά φροντίδας του δέρματος, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι τα γένη Σπιρουλίνα και Χλωρέλλα. Τα εκχυλίσματα μικροφυκών μπορούν να βρεθούν κυρίως σε προϊόντα φροντίδας προσώπου και δέρματος (αντιγηραντικές κρέμες και αναγεννητικά προϊόντα φροντίδας). Επίσης, εφαρμόζονται για προστασία από τον ήλιο και για την φροντίδα των μαλλιών. Αξιοσημείωτα είναι δύο παραδείγματα από διαθέσιμα προϊόντα στο εμπόριο. Αρχικά, εκχυλίσματα πλούσια σε πρωτεΐνη από το μικροφύκος Σπιρουλίνα επιδιορθώνουν τα σημάδια της πρόωρης γήρανσης του δέρματος και εμποδίζουν το σχηματισμό ρυτίδων. Η εμπορική τους ονομασία είναι «Protulines» και παρασκευάζονται από την εταιρία Exsymol SAM στο Μονακό. Δεύτερο παράδειγμα αποτελούν τα εκχυλίσματα από την *Chlorella Vulgaris* που διεγείρουν την σύνθεση του κολλαγόνου στο δέρμα, αναγεννώντας, έτσι, τους ιστούς και μειώνοντας τις ρυτίδες. Η εμπορική ονομασία είναι «DermoChlorella» και παράγονται από την Codif στην Γαλλία (Spolaore et al. 2006).

1.3.4. Εφαρμογές ως εδαφοβελτιωτικά

Ιστορικά, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνταν ως λιπάσματα εδάφους και εδαφοβελτιωτικά σε παράκτιες περιοχές σε όλον τον κόσμο. Η εδαφοβελτιωτική δράση των φυκών οφείλεται στην ικανότητα της βιομάζας τους να κατακρατούν μεγάλες ποσότητες νερού και να βελτιώνουν τα δομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του εδάφους. Επίσης, τα φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αργής αποδέσμευσης (slow release). Οι ιδιότητες αυτές αξιοποιούνται σήμερα,

χρησιμοποιώντας υγρά λιπάσματα παρασκευασμένα από μικροφύκη κατά την πρώτη κάλυψη (στρώση) σε εδάφη, όπως εγκαταλελειμμένες εκτάσεις ορυχείων, προκειμένου να αποφευχθεί η διάβρωση.

Τέλος, άλλη μια ευεργετική επίδραση των μικροφυκών οφείλεται και στις βιοενεργές ουσίες τους που επηρεάζουν θετικά τα ανώτερα φυτά. Η δέσμευση αζώτου από τα μικροφύκη είναι σημαντική για την παραγωγή ρυζιού στην γεωργία. Επίσης, οι αντι-διαβρωτικές ικανότητές τους είναι σημαντικές για τις ξηρές περιοχές. Ουσίες κι εκχυλίσματά τους φάνηκαν να προάγουν την βλάστηση, την ανάπτυξη των φύλλων και την ανθοφορία. Μελλοντικά, τα προϊόντα από μικροφύκη θα χρησιμοποιούνται ως «φυτοπροστατευτικά», δηλαδή κατά των ασθενειών των φυτών από ιούς και βακτήρια (Pulz & Gross 2004; Spolaore et al. 2006).

1.3.5. Εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμων

Προσφάτως, τα μικροφύκη έχουν προσελκύσει πολύ έντονα το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών για την παραγωγή βιοενέργειας ως μια από τις απαντήσεις στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την αυξανόμενη χρήση ορυκτών καυσίμων και από την συσσώρευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) στην ατμόσφαιρα. Η παραγωγή βιομάζας μικροφυκών και κατ' επέκταση βιοενέργειας έχει όλα εκείνα τα πλεονεκτήματα της χρήσης ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της καλλιέργειας μικροφυκών για παραγωγή ενέργειας είναι τα εξής:

- 1) είναι αποδοτικά βιολογικά συστήματα για την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, έχοντας συγκρίσιμο ή και μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα επίγεια φυτά
- 2) είναι απλοί οργανισμοί χωρίς πολύπλοκα αναπαραγωγικά όργανα των οποίων μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρη η βιομάζα τους
- 3) είναι μικροοργανισμοί που ακολουθούν υπό ευνοϊκές συνθήκες έναν απλό κύκλο κυτταρικής διαίρεσης,
- 4) η καλλιέργειά τους μπορεί να γίνει σε αλμυρό ή υφάλμυρο νερό,
- 5) η καλλιέργειά τους μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως λιπάσματα απόβλητα και απόβλητα από διάφορους παραγωγικούς τομείς,
- 6) η στρεμματική απόδοση σε βιομάζα είναι συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των επίγειων φυτών και η παραγωγή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις.

Παρόλα αυτά, η καλλιέργεια μικροφυκών παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, με τα βασικότερα να είναι το μεγάλο κόστος εγκατάστασης των καλλιεργητικών μονάδων και λειτουργίας τους και κατ' επέκταση το αυξημένο κόστος παραγωγής βιομάζας (Brennan & Owende 2010; Chisti 2007). Για την παραγωγή βιοενέργειας από μικροφύκη, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά σε εκείνα μόνο τα είδη που η βιομάζα τους περιέχει αυξημένη ποσότητα σε λιπίδια. Τα λιπίδια

ενδιαφέρουν γιατί αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ μετά την μετεστεροποίησή τους σε μεθυλεστέρες (Chisti 2007). Τα μικροφύκη αποτελούν πρώτη ύλη για την παραγωγή ενέργειας ή βιοκαυσίμων μέσω διαφόρων ενεργειακών τεχνολογιών μετατροπής της βιομάζας σε ενέργεια, όπως για παράδειγμα μέσω της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή βιοαερίου, μέσω της πυρόλυσης για πυρολυτικά έλαια, μέσω της αεριοποίησης για αέρια σύνθεσης (syngas), μέσω της αναερόβιας ζύμωσης για βιοαιθανόλη και διάφορα άλλα βιοκαύσιμα (Demirbas 2010; Kruse & Hankamer 2010). Αυτές οι μετατροπές μπορούν να ταξινομηθούν ως βιοχημικές μετατροπές, χημικές αντιδράσεις, αμέσες κάυσεις και θερμοχημικές μετατροπές. Το περιεχόμενο των μικροφυκών σε σύγκριση με το περιεχόμενο άλλων πρώτων υλών σε πετρέλαιο φαίνεται στον Πίνακα 7 (Priyadarshani & Rath 2012)

Πίνακας 7. Σύγκριση των μικροφυκών και άλλων πρώτων υλών βιοντίζελ (Priyadarshani & Rath 2012)

Πηγή Φυτού	Περιεχόμενο Έλαιο σε Καρπό (% έλαιο σε βάρος της βιομάζας)	Απόδοση Ελαίου (L ελαίου/ha το έτος)	Χρήση Γης (m ² το έτος/kg βιοντίζελ)	Παραγωγή Βιοντίζελ (kg βιοντίζελ /εκτάριο το έτος)
Καλαμπόκι/ Αραβόσιτος (<i>Zea mays L.</i>)	44	172	66	152
Κύαμος σόγιας (<i>Glycine max L.</i>)	18	636	18	562
Καμελίνα (<i>Camelina sativa L.</i>)	42	915	12	809
Ελαιοκράμβη (<i>Brassica napus L.</i>)	41	974	12	862
Ηλίανθος (<i>Helianthus annuus L.</i>)	40	1070	11	946
Φοινικέλαιο (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Μικροφύκη (χαμηλής περιεκτικότητας σε έλαιο)	30	58700	0,2	51927
Μικροφύκη (μέσης περιεκτικότητας σε έλαιο)	50	97800	0,1	86515
Μικροφύκη (υψηλής περιεκτικότητας σε έλαιο)	70	136900	0,1	121104

1.3.6. Εφαρμογές στην διαχείριση αποβλήτων και απόνευρων

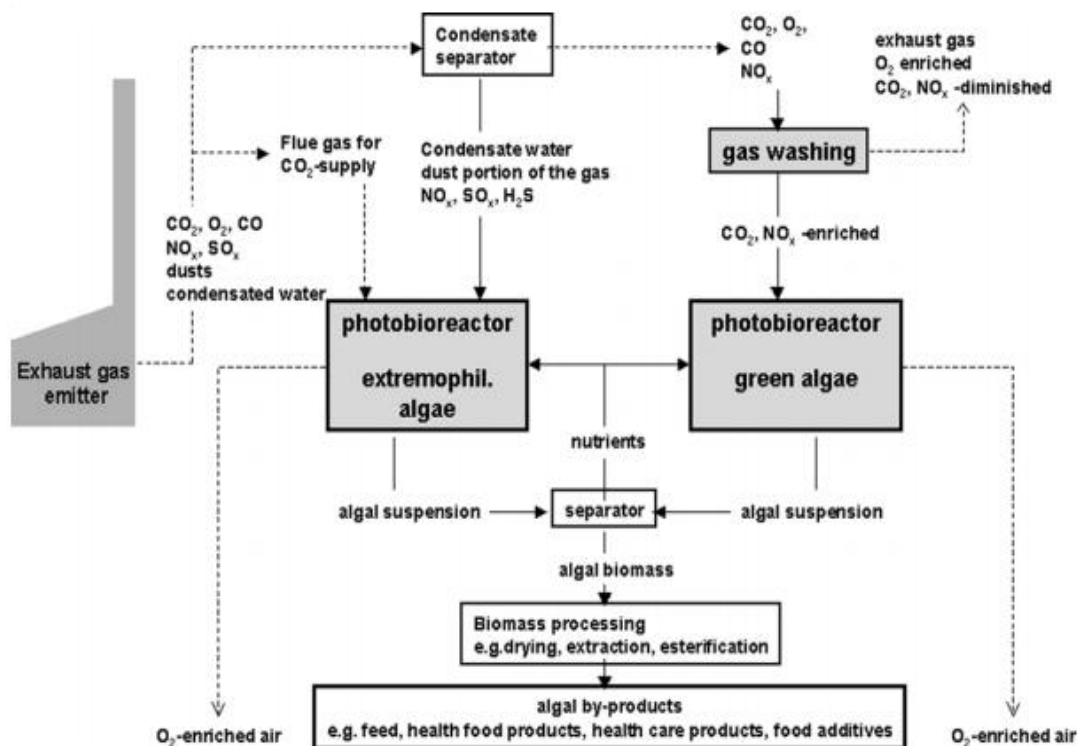
Ήδη από τη δεκαετία του 1960 είχε προταθεί η καλλιέργεια μικροφυκών σε απόβλητα και απόνευρα του βιομηχανικού, αστικού, γεωργο-κτηνοτροφικού και του τομέα της βιομηχανίας τροφίμων. Η καλλιέργεια φυκών στα απόβλητα έχει ένα διττό σκοπό: από την μία να παραχθεί χρήσιμη βιομάζα (η οποία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί

κατάλληλα, όπως ως εδαφοβελτιωτικό ή για βιοενέργεια) και από την άλλη να επιτευχθεί απορρύπανση των αποβλήτων και των απόνευρων με την μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών και ανόργανων ρύπων (κατά κύριο λόγο νιτρικά/αμμωνιακά και φωσφορικά στοιχεία). Η απορρύπανση των αποβλήτων είναι στην ουσία μια ανάκτηση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στα απόβλητα και με αυτό τον τρόπο μειώνεται η επίδρασή τους στα φαινόμενα του ευτροφισμού, της ρύπανσης υπόγειων νερών και άλλων φαινομένων (Pittman et al. 2011).

Τα μικροφύκη για να μπορέσουν να αυξηθούν και να πολλαπλασιαστούν πρέπει να προσλάβουν συγκεκριμένα ανόργανα στοιχεία (C, N, P, K, S και άλλα). Ειδικά η καλλιέργεια ορισμένων μικροφυκών, που περιέχουν υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, προϋποθέτει την εφαρμογή σημαντικών ποσοτήτων ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων. Από την σκοπιά της περιβαλλοντικής προστασίας, αλλά και της οικονομικότητας, η χρήση συνθετικών αζωτούχων (αλλά και φωσφορικών) λιπασμάτων δεν αποτελούν λύση αειφορίας. Για την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών σε θρεπτικά στοιχεία αλλά και για την αποφυγή χρήσης συνθετικών λιπασμάτων, η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να γίνει σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν απόβλητα (Posten & Schaub 2009). Η παραγωγή βιομάζας με τη χρήση αποβλήτων κυμαίνεται έντονα ανάλογα με το είδος του μικροφύκου και το είδος του αποβλήτου. Σε πειραματικές έρευνες έχει αναφερθεί παραγωγή από $5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ξηρή ουσία) (Mulbry & Wilkie 2001) μέχρι και $70,0 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ξηρή ουσία) (Lincoln et al. 1996). Η μείωση των ανόργανων ρυπαντών (N και P) στα απόβλητα μετά την διαχείρισή τους με μικροφύκη μπορεί να ανέλθει στο 70-90% και η μείωση των οργανικών ρυπαντών μέχρι και 70% (COD) (Abreu et al. 2012).

1.3.7. Εφαρμογές στο περιβάλλον

Παγκοσμίως, οι κυβερνήσεις και οι εταιρίες ενέργειας οφείλουν να λαμβάνουν μέτρα για την αντιμετώπιση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και αυτό μπορεί να γίνει μέσω της βιοτεχνολογίας. Σε πολλές χώρες, όπως τη Νορβηγία, την Ιαπωνία, την Ιταλία και τις Η.Π.Α., έχουν διεξαχθεί έρευνες, ώστε να βρεθούν οικονομικά εφικτές διαδικασίες που αφορούν την εφαρμογή των μικροφυκών στην προστασία του περιβάλλοντος και στην ρύθμιση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Στην Γερμανία, εκτελείται ένα έργο που χρησιμοποιεί απόβλητα αέρια και το συμπυκνωμένο τους νερό για να παράγει βιομάζα μικροφυκών. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ένα φωτοβιοαντιδραστήρα (photobioreactor, PBR) και φάνηκε να είναι εφικτή, αλλά αντι-οικονομική. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κλειστών κύκλων υλικών (closed material cycles) συνδιάζοντας διαφορετικές ροές λυμάτων με παραγωγή βιομάζας υψηλής προστιθέμενης αξίας. Το Σχήμα 1 απεικονίζει ένα παράδειγμα μιας ροής υλικού που περιλαμβάνει μια μονάδα παραγωγής μικροφυκών και φάνηκε να είναι οικονομικά εφικτή (Pulz & Gross 2004).



Σχήμα 1. Ροή υλικού με παραγωγή φυκών

1.4. Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιέργειών. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες κλπ. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). (Richmond 1992). Τα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα του κάθε τύπου καλλιέργειας αναλύονται παρακάτω. Πρέπει να τονιστεί ότι η τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την βέλτιστη παραγωγή του εκάστοτε είδους. Στον Πίνακα 8 που ακολουθεί, αναγράφονται οι βέλτιστοι τύπου καλλιέργειών για διάφορα είδη μικροφυκών.

Πίνακας 8. Οι μέθοδοι καλλιέργειας για ορισμένα είδη μικροφυκών (Harun et al. 2010)

Είδος/Κατηγορία	Μέθοδος Καλλιέργειας
<i>Spirulina platensis</i> / Κυανόφυτα	Ανοιχτές δεξαμενές, Φυσικές λίμνες
<i>Chlorella vulgaris</i> /Χλωρόφυτα	Ανοιχτές δεξαμενές, Λεκάνες, Γυάλινο σωλήνας, PBR
<i>Dunaliella salina</i> /Χλωρόφυτα	Ανοιχτές δεξαμενές, PBR
<i>Haematococcus pluvialis</i> /Χλωρόφυτα	Ανοιχτές δεξαμενές, PBR
<i>Porphyridium cruentum</i> / Ροδόφυτα	Σωληνοειδής PBR
<i>Muriellopsis sp.</i> /Χλωρόφυτα	Ανοιχτές δεξαμενές, PBR

1.4.1. Ανοικτού τύπου καλλιέργειες

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες (Εικόνα 5) έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν σχετικά μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας από τις κλειστού τύπου καλλιέργειες και έχουν σχετικά καλή δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera et al. 2010).

Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, όμως, τα μειονεκτήματα είναι ποικίλα:

- 1) Τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνήθως επιμολύνονται από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών ή μικροοργανισμών. Αυτό αλλοιώνει την σύσταση των καλλιεργειών και έχει ως αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day et al. 2012).
- 2) Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες πάσχουν επιπλέον από την εξάτμιση νερού που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων, που από ένα επίπεδο και πάνω επιδρούν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης νερού, άρα και χρήση μεγάλων ποσοτήτων του. Παρόλα αυτά το νερό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι και μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές.
- 3) Επίσης, η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker et al. 2011).
- 4) Άλλο μειονέκτημα είναι ότι σε ορισμένες τοποθεσίες, οι περίοδοι καλλιέργειας είναι περιορισμένες, λόγω έντονων εποχιακών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων ή χαμηλών θερμοκρασιών και ηλιοφάνειας. Για τον λόγο αυτό χώρες με μεγάλη διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας, όπως η Ελλάδα, έχουν πλεονέκτημα για την εγκατάσταση καλλιέργειας μικροφυκών, δεδομένου ότι η παραγωγή σε βιομάζα μπορεί να είναι ως και δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με περιοχές με μικρή διάρκεια και ένταση ηλιοφάνειας (Brányiková et al. 2011)

Τα προβλήματα των ανοικτών καλλιεργειών μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση κατάλληλων συνθηκών για το είδος του μικροφύκου. Αποτελεσματικές συνθήκες είναι συνήθως οι ακραίες και εξειδικευμένες συνθήκες, όπου μόνο το επιλεχθέν μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ είναι ακατάλληλες για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα ειδών που καλλιεργούνται σε ακραίες συνθήκες είναι η *Dunaliella salina* που καλλιεργείται σε αλμυρά νερά (>20% άλας) ή η Σπιρουλίνα (*Spirulina Platensis*) που καλλιεργείται σε αλκαλικά περιβάλλοντα (> pH 9,2) (Brennan & Owende 2010).

Το σύστημα ανάδευσης των ανοικτών καλλιέργειών είναι μεγάλης σημασίας και στην ουσία αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των διαφόρων τύπων δεξαμενών. Η ανάδευση είναι αναγκαία γιατί εμποδίζει την συσσωμάτωση και καθίζηση των μικροφυκών, αυξάνει την αξιοποίηση του φωτός, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα ή/και οργανικά στοιχεία πιο προσπελάσιμα για την πρόσληψή τους από τα μικροφύκη (Chaumont 1993).

Σημαντική παράμετρος για τον σχεδιασμό ανοικτών δεξαμενών είναι το βάθος της δεξαμενής, το οποίο δεν θα πρέπει να είναι πολύ μεγάλο για να επιτρέπεται η διείσδυση του φωτός, αλλά ούτε και πολύ μικρό για να μην αλλάζει η συγκέντρωση των ιόντων του υποστρώματος λόγω της εξάτμισης του νερού. Το βάθος της δεξαμενής θεωρείται βέλτιστο μεταξύ 20 και 30 cm (Borowitzka 1999).



Εικόνα 5. Ανοικτού τύπου καλλιέργειες για την παραγωγή μικροφυκών (α. Τύπου raceway και β. Κυκλική)

1.4.2. Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κλειστούς περιέκτες, τους φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν. Υπάρχουν φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδοι σαν ηλιακοί συλλέκτες (Εικόνα 6), κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκεις αγωγούς κατασκευασμένοι από διάφορα διάφανα υλικά (γυαλί ή πλαστικό) (Εικόνα 6) ή ελικοειδούς μορφής. Επίσης απλής κατασκευής φωτοβιοαντιδραστήρες θεωρούνται αυτοί του τύπου σακών πολυαιθυλενίου (Εικόνα 6) (Brennan & Owende 2010; Chisti 2007).



Εικόνα 6. Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών: 1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, 2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, 3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι:

- 1) καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας
- 2) μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου
- 3) σε ορισμένους τύπους φωτοβιοαντιδραστήρων καλύτερος έλεγχος της παροχέτευσης και της κίνησης των αερίων (πχ CO₂)
- 4) περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας
- 5) καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας
- 6) σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο
- 7) προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς
- 8) σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές και
- 9) η δυνατότητα καλλιέργειας σε τύπο μιξοτροφίας ή ετεροτροφίας χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα επιμόλυνσης (Chisti 2007).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές, οι καλλιέργειες αυτού του τύπου έχουν αυξημένα κόστη κατασκευής και λειτουργίας όπως και περιορισμένες δυνατότητες να κατασκευαστούν σε μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις (scaled-up), λόγω της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Κατά την φωτοσύνθεση των μικροφυκών παράγεται μοριακό οξυγόνο, το οποίο, λόγω των συνθηκών εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα, διαλύεται στο υγρό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να απομακρύνεται με κάποιο τρόπο γιατί μεγάλες συγκεντρώσεις του είναι ανασταλτικές για την ανάπτυξη και μερικές φορές, σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις φωτός, προκαλείται φωτοοξείδωση (Chisti 2007; Molina et al. 2001).

Ο σχεδιασμός των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι μια πολύπλοκη υπόθεση και προϋποθέτει την καλή γνώση διαφόρων φυσικών και βιολογικών φαινομένων. Τα κυριότερα υποσυστήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι: 1) το σύστημα φωτισμού, 2) το σύστημα εμπλουτισμού με CO₂, 3) το σύστημα ανάδευσης, 4) το σύστημα απομάκρυνσης O₂ και διαχωρισμού αερίων, 5) το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και 6) το σύστημα θρέψης (Chisti 2007; Molina et al. 2001).

1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών είναι αρκετά πολύπλοκα συστήματα και η ανάπτυξή τους επηρεάζεται από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, οι κυριότεροι εκ των οποίων αναλύονται παρακάτω.

1.5.1. Φωτισμός

Η διάρκεια, η ένταση και η ποιότητα του φωτισμού είναι οι πιο καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των μικροφυκών, ιδιαίτερα στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες. Γενικά, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροφυκών αυξάνεται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας μέχρι ένα όριο. Τα περισσότερα μικροφύκη κορένονται σε ένταση φωτισμού μεταξύ 200 και 400 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$, αλλά αυτό εξαρτάται από την πυκνότητα της καλλιέργειας. Μετά το όριο αυτό ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός και από ένα σημείο και έπειτα μειώνεται λόγω της βλάβης που υφίστανται τα κύτταρα λόγω φωτοοξειδωσης Η πηγή του φωτός μπορεί να είναι είτε φυσική (ήλιος) είτε τεχνητή (λαμπτήρες). Ειδικά σε περιπτώσει μικροφυκών που καλλιεργούνται για υψηλής αξίας προϊόντα ο τεχνητός φωτισμός παρέχει πιο σταθερές ελεγχόμενες συνθήκες και έτσι προτιμάται (Molina Grima et al. 1999; Carvalho et al. 2011).

1.5.2. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο δεύτερος καθοριστικός παράγοντας. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται μεταξύ 20-30°C, αλλά υπάρχουν και θερμοφιλά στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 40-42°C. Πολλά μικροφύκη μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες μέχρι και 15 °C χαμηλότερα από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, αλλά υπάρχει πιθανότητα, με μια μεταβολή της τάξης των 2-4°C πάνω από το βέλτιστο σημείο, να υπάρξει πλήρης απώλεια της καλλιέργειας. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται και το σημείο έντασης του φωτισμού που δημιουργεί ανασταλτικές συνθήκες ή φωτοοξειδωση. Για τους παραπάνω λόγους, είναι αναγκαίο να υπάρχει εγκατεστημένο σύστημα ψύξης της καλλιέργειας (Carvalho et al. 2011; Richmond 1992).

1.5.3. Θρεπτικά στοιχεία

Τα μικροφύκη για να πολλαπλασιαστούν χρειάζονται διάφορα ανόργανα στοιχεία, τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία) είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες τα μικροστοιχεία όπως το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), όπως και διάφορα άλλα μέταλλα (πχ μόλυβδος, νικέλιο, κλπ) (Richmond 1992).

1.5.4. Άνθρακας

Τα μικροφύκη, ως φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί, μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια και τον ανόργανο άνθρακα (CO₂), μέσω πολύπλοκων βιοχημικών

διεργασιών, σε οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Το CO₂, όταν είναι διαλυμένο στο νερό, βρίσκεται είτε σε μορφή διτανθρακικής ρίζας (HCO₃⁻) για τιμές pH όπου αναπτύσσονται τα περισσότερα μικροφύκη, είτε σε μορφή ανθρακικής ρίζας (CO₃²⁻) σε μεγαλύτερες τιμές pH. Τα μικροφύκη έχουν έναν μηχανισμό (carbon concentrating mechanism), κατά τον οποίο το διαλυμένο CO₂ συγκεντρώνεται γύρω από το κύτταρο και είτε ο άνθρακας απορροφάται ως διτανθρακική ρίζα, είτε με την βοήθεια ενζύμων (carbonic anhydrase) απορροφάται σε μορφή CO₂ (Badger & Price 2003).

Για την παραγωγή ενός κιλού ξηρής βιομάζας μικροφυκών χρειάζονται περίπου 1.8 κιλά CO₂. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα είναι περίπου 360 ppmv (0,036%) και τα μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε υπόστρωμα που περιέχει ως και 15% διαλυμένο CO₂, η παροχή του από την ατμόσφαιρα στις καλλιέργειες προϋποθέτει μεγάλους όγκους αέρα (Brennan & Owende 2013).

1.5.5. Άζωτο

Το άζωτο συμμετέχει σε αρκετά σημαντικά βιοχημικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA, RNA κλπ) και η παροχή του είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Η περιεκτικότητα του αζώτου στην βιομάζα των μικροφυκών μπορεί να ανέλθει ακόμα και στο 10%. Το άζωτο μπορεί να προσληφθεί από διάφορες μορφές όπως αμμωνιακό άζωτο, νιτρικό, μοριακό από την ατμόσφαιρα και λιγότερο από τη νιτρώδη μορφή. Η παροχή νιτρικών αλάτων έχει δείξει ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας (Costa et al. 2001). Για την μείωση του κόστους παραγωγής, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να αντικαταστήσουν τα νιτρικά άλατα με φτηνότερα υλικά, όπως η ουρία (CH₄N₂O).

1.5.6. Φώσφορος

Ουσιαστικής σημασίας θρεπτικό στοιχείο είναι και ο φώσφορος, ο οποίος συμμετέχει διάφορα μακρομόρια, όπως φωσφολιπίδια, αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ (ATP) κ.α. Τα μικροφύκη περιέχουν λιγότερο από 1% φώσφορο στη βιομάζα τους, παρόλα αυτά, αυτός είναι ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, ειδικότερα σε φυσικά περιβάλλοντα. Ο φώσφορος προσλαμβάνεται από τα μικροφύκη ως ορθοφωσφορική ρίζα (PO₄³⁻). Όταν η συγκέντρωση φωσφόρου στο περιβάλλον είναι χαμηλή τότε τα μικροφύκη τον αποθηκεύουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που χρειάζονται άμεσα και η αποθήκευση αυτή μπορεί να καλύψει τις ανάγκες δύο ή ακόμα και τριών κύκλων διαίρεσης (γενιές) (Powell et al. 2011).

1.5.7. Αλατότητα

Υπάρχουν είδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα η *Dunaliella salina* που αναπτύσσονται καλύτερα σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά με σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων (μεταξύ 20 και 24 g l⁻¹, αν και κάθε είδος έχει την δικιά του βέλτιστη τιμή). Άλλα μικροφύκη, όπως για παράδειγμα τα γένη *Chlorella*, *Σπιρουλίνα* και *Porphyridium* είναι απλώς ανεκτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, παρόλο που δεν τις προϋποθέτουν. Πολλά είδη δεν αναπτύσσονται σε υποστρώματα με

αλατότητα περισσότερη από 4 g l^{-1} . Η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (Richmond 2004)

1.5.8. pH

Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλον με pH που κυμαίνεται μεταξύ 7 και 9. Παρόλα αυτά, υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*), αλλά και αλκαλόφιλα (όπως η Σπιρουλίνα). Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια. Κατά την φωτοσύνθεση, το pH της καλλιέργειας έχει την τάση να αυξάνεται. Αν αυξηθεί πάνω από μια τιμή τότε επέρχεται κυτταρόλυση. Το αντίθετο συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται αμμωνία ως πηγή αζώτου, όπου το pH μειώνεται. Μεγάλες τιμές του pH ευνοούν την στερεοποίηση και καθίζηση του φωσφόρου με ανάλογες επιπτώσεις στην καλή ανάπτυξη των μικροφυκών (Richmond 2004).

Κεφάλαιο 2. *Spirulina Platensis*

Η Σπιρουλίνα ανήκει στην κλάση των κυανοβακτηρίων με χαρακτηριστική φωτοσυνθετική ικανότητα. Είχε ταξινομηθεί αρχικά στο φυτικό βασίλειο λόγω του πλούτου της σε χρωστικές που έχουν τα φυτά, αλλά και λόγω της ικανότητάς της να φωτοσυνθέτει. Αργότερα, τοποθετήθηκε στο βασίλειο των βακτηρίων, μετά την κατανόηση της γενετικής, φυσιολογίας και των βιοχημικών ιδιοτήτων της (Deng & Chow 2010). Το κυτταρικό τοίχωμα της Σπιρουλίνας στερείται κυτταρίνης, αλλά περιλαμβάνει ολιγο- και πολυ- σακχαρίτες. Έτσι, αφομοιώνεται κατά 85-95% από έναν οργανισμό (Babadzhanov et al. 2004)

Ανάμεσα στα πολλά είδη της, τρία ξεχωρίζουν και έχουν διερευνηθεί εντατικά, χάρη στο γεγονός ότι είναι βρώσιμα με θεραπευτικές και θεραπευτικές αξίες. Αυτά είναι: η *Spirulina Platensis*, η *Spirulina maxima* και η *Spirulina fusiformis* (Deng & Chow 2010).

2.1. Χημική Σύθεση

Η *Spirulina Platensis* είναι πλούσια πηγή πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων, όπως επίσης και στοιχείων σαν το μαγνήσιο, τον ψευδάργυρο, το μαγγάνιο, το σελήνιο και βιταμινών, συμπεριλαμβανομένου του β-καροτενίου, της ριβοφλαμίνης, της κυανοκοβαλαμίνης και του α-λιποϊκού οξέος (Karadeniz et al. 2008). Όπως έχει αναφερθεί, τα κυανοβακτήρια, στα οποία κατατάσσεται η Σπιρουλίνα, έχουν μεγάλη ποικιλία χρωστικών συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών, των χλωροφυλλών και των φυκοβιλιπρωτεϊνών.

Ένα εκ των σπουδαιότερων καροτενοειδών, η σημασία των οποίων έχει αναλυθεί παραπάνω, είναι το β-καροτένιο (Προβιταμίνη Α). Το β-καροτένιο ήταν ο πρώτος βιοδραστικός παράγοντας που παράχθηκε για εμπορική χρήση. Είναι μία φυτική ουσία που μετατρέπεται σε βιταμίνη Α από τον οργανισμό. Βοηθάει στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή, στην όραση και στην καλή κατάσταση του δέρματος και των μαλλιών. Επιπλέον αποτελεί αντιοξειδωτικό παράγοντα και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Χρησιμοποιείται ως συστατικό προστασίας από τον ήλιο, χάρη στην ικανότητά του να προστατεύει το δέρμα από την υπεριώδη ακτινοβολία. Προέρχεται κυρίως από την *Spirulina Platensis* και έπειτα από το φύκος *Dunaliella salina* (Se-Kwon Kim 2015)

Οι φυκοβιλίνες είναι πρωτεΐνες που συναντώνται μόνο στα κυανοβακτήρια και στους χλωροπλάστες των ερυθροφυκών και οι κυριότερες είναι η φυκοκυανίνη (μπλε χρωστική) (phycocyanin), η αλλοφυκοκυανίνη (allo-phycocyanin) και η φυκοερυθρίνη (κόκκινη χρωστική) (phycocerythrin), οι οποίες δομούνται από ανόμοιες υπομονάδες α και β πολυπεπτιδίων. Οι φυκομπιλιπρωτεΐνες συσσωματώνονται σε δομές που ονομάζονται φυκομπιλισώματα, τα οποία προσκολλούνται σε συστάδες στην εξωτερική επιφάνεια της θυλακοειδούς μεμβράνης και δρουν ως συλλεκτες ηλιακού φωτός στα κυανοβακτήρια και τα ροδοφύκη. Τα φυκομπιλισώματα αποτελούνται από πυρήνες αλλοφυκοκυανίνης που περιβάλλονται περιφερειακά από μόρια

φυκοκυανίνης. Η φυκοκυανίνη χρησιμοποιείται ως χρωστική ουσία στα τρόφιμα (τσίχλες, γαλακτοκομικά) και σε καλλυντικά (κραγιόν) στην Ιαπωνία, στην Κίνα και την Ταϊλάνδη. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι έχει θεραπευτική αξία (αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες). Λόγω των ιδιοτήτων φθορισμού, έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία, καθώς μικρές ποσότητες φυκοκυανίνης περιλαμβάνονται ως βιοχημικοί ιχνηθέτες σε ανοσοανάλυσεις (Sarada et al. 1999). Η Σπιρουλίνα είναι μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών με το πρωτεϊνικό της κλάσμα να περιέχει μέχρι και 20% φυκοκυανίνη. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την εκχύλιση φυκοκυανίνης, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι η μέθοδος κυτταρικής διάσπασης, ο τύπος του διαλύτη, η αναλογία βιομάζας- διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης (Silveira et al. 2007).

2.2. Εφαρμογες

Το κυανοβακτήριο *Spirulina Platensis* αποτελεί σπουδαίο αντικείμενο βιοτεχνολογικής έρευνας, χάρη στην οικονομική, οικολογική και διατροφική αξία του. Το μικροφύκος αυτό έχει μεγάλες δυνατότητες στον τομέα παραγωγής τροφίμων και σχετικών διατροφικών υλικών, όπως χρωστικές ουσίες, βιταμίνες, γ-λινολενικά οξέα και ένζυμα (Costa et al. 2000).

Το ενδιαφέρον για την παραγωγή βιομάζας από μικροφύκη έχει γίνει πολύ έντονο τα τελευταία 50 χρόνια, λόγω παγκόσμιας έλλειψης τροφής. Τα κυανοβακτήρια, και ιδιαίτερα η Σπιρουλίνα, χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ανθρώπων στην Ασία και την Αφρική, λόγω του υψηλού πρωτεϊνικού τους περιεχομένου. Επίσης, η καλλιέργεια της Σπιρουλίνας είναι διαδεδομένη στην υδατοκαλλιέργεια, χάρη στην χρήση των χρωστικών της για τροφή των τροπικών ψαριών (De Oliveira et al. 1999). Οι σημαντικότεροι εμπορικοί παραγωγοί Σπιρουλίνας βρίσκονται στον Πίνακα 9 (Holman & Malau-Aduli 2013)

Πίνακας 9. Μερικοί παραγωγοί Σπιρουλίνας και η τοποθεσία τους (Holman & Malau-Aduli 2013)

Επωνυμία εταιρίας	Τοποθεσία
Earthrise Farms	Calipatria, California (ΗΠΑ)
Cyanotech Corporation	Kailua Kona, Χαβάη (ΗΠΑ)
Myanmar Microalgae Biotechnology Project	Yangon (Μιανμαρ)
Hainan DIC Microalgae	Hainan (Κίνα)
Nao Pao Resins Chemical	Tainan, Ταϊβάν (Κίνα)
Solarium Biotechnology	La Huayca (Χιλή)
DIC LIFETEC	(Ιαπωνία)
Neotech Food	Banpong, Rajburi (Ταϊλάνδη)
TAAU Australia	Darwin, Northern Territory (Αυστραλία)
Sosa Texcoco	Λίμνη Texcoco (Μεξικό)
Hills-Koor Alga Production	Eilat (Ισραήλ)

Το μικροφύκος της *Spirulina Platensis* έχει εκτεταμένη χρήση στην φαρμακευτική. Είναι γνωστό ότι τα εκχυλίσματά της έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση in vitro και in vivo. Εκτός αυτού, έχουν αντικαρκινικές, αντικές, ηπατοπροστατευτικές, και ανοσοποιητικά βελτιωτικές επιδράσεις. Επίσης, πειράματα σε ποντικούς έχουν δείξει πως το μικροφύκος μπορεί να παρέχει προστατευτική δράση κατά των νεφρικών παθήσεων (Karadeniz et al. 2008).

2.3. Καλλιέργεια

Η Σπιρουλίνα μεγαλώνει φυσικά σε δεξαμενές με αλκαλικά νερά με υψηλή περιεκτικότητα αλατιού σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές, όπως η Αμερική, το Μεξικό, η Ασία και η κεντρική Αφρική. Οι κλιματολογικές συνθήκες στην Κεντρική Ασία είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη της Σπιρουλίνας. (Deng & Chow 2010).

Οι Walach και άλλοι (1987) μελέτησαν τον σχηματισμό των χρωστικών ουσιών και των λιπαρών οξέων της *Spirulina pl.* και συμπέραναν ότι οι συνθήκες της καλλιέργειας καθορίζουν, όχι μόνο την μορφολογία, αλλά και την σύνθεσή της. Επίσης, σε περιβάλλον με περιορισμένο άζωτο αυξάνεται το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα. Οι Mahajan & Kamat (1995) παρατήρησαν ότι η χρήση ουρίας ως πηγή αζώτου και η μείωση του φωτισμού προκάλεσαν αύξηση του γ-λινολενικού οξέος. Άλλος σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη αυτού του κυανοβακτηρίου είναι η αρχική συγκέντρωση βιομάζας (Costa et al. 2000)

Κεφάλαιο 3. *Chlorella Vulgaris*

Η *Chlorella* είναι ένα πράσινο ευκαρυωτικό φύκος, το οποίο καλλιεργείται σε μεγάλες τεχνητές λίμνες γλυκού νερού, με ελεγχόμενες συνθήκες. Είναι ένα από τα πιο μελετημένα και δημοφιλή φύκη παγκοσμίως, χάρη στα ποικίλα ευεργετικά αποτελέσματά του για την υγεία του σύγχρονου ανθρώπου.

3.1. Χημική Σύνθεση

3.1.1. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε σημαντικούς ρόλους, όπως η ανάπτυξη, επισκευή και συντήρηση των κυττάρων, χρησιμεύουν ως κυτταρικοί κινητήρες, χημικοί αγγελιοφόροι και ρυθμιστές των κυτταρικών δραστηριοτήτων και συμβάλλουν στην άμυνα κατά των ξένων εισβολέων. Το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο της ξηρής βιομάζας της *Chlorella Vulgaris* είναι 42-58% και ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης.

Η πρωτεϊνική διατροφική ποιότητα καθορίζεται από το προφίλ των αμινοξέων και όπως η πλειοψηφία των μικροφυκών, το προφίλ αμινοξέων της *Chlorella Vulgaris* είναι ευνοϊκό για την ανθρώπινη διατροφή, όπως προτάθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), επειδή τα κύτταρά της συνθέτουν απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα. Ακόμη, ανεξάρτητα από τη διαδικασία εκχύλισης, οι πρωτεΐνες της έδειξαν εξαιρετική ικανότητα γαλακτωματοποίησης που είναι καλύτερη από ό, τι πολλά εμπορικά συστατικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των πρωτεϊνών εκχυλισμένων σε pH 7 είναι 3090 ± 50 mL ελαίου / g πρωτεΐνης με σταθερότητα $79 \pm 1\%$. Επομένως, οι πρωτεΐνες της *Chlorella Vulgaris* ανοίγουν την πύλη για πρόσθετες επιλογές αξιοποίησης αυτού του μικροφύκου στην αγορά, κα ιδίως στον τομέα των τροφίμων (Safi et al. 2014).

3.1.2. Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων που ορίζονται, όχι από την δομή τους, αλλά μάλλον από το γεγονός ότι είναι διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες και σχετικά αδιάλυτα στο νερό. Κατά τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, η *C. vulgaris* μπορεί να περιέχει 5-40% λιπίδια κατά ξηρό βάρος βιομάζας, τα οποία αποτελούνται κυρίως από γλυκολιπίδια, κηρούς, υδρογονάνθρακες, φωσφολιπίδια, και μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων (Safi et al. 2014).

3.1.3. Χρωστικές

Η *Chlorella Vulgaris* περιέχει τις πράσινες φωτοσυνθετικές χρωστικές: χλωροφύλλη α και β στους χλωροπλάστες της, οι οποίες μπορούν να φτάσουν το 1-2% του ξηρού βάρους και μάλιστα το γένος *Chlorella* αποτελεί την υψηλότερη πηγή χλωροφύλλης στον κόσμο. Επίσης περιέχει σημαντικά ποσά καροτενοειδών, όπως α- και β-

καροτένιο (Πίνακας 10) (Plaza, Santoyo, Jaime, Avalo, Cifuentes, Reglero, García-Blairsy Reina, et al. 2012).

Πίνακας 10 Το περιεχόμενο της *Chlorella Vulgaris* σε χρωστικές για διάφορες συνθήκες ανάπτυξης (Safi et al. 2014).

Χρωστικές ουσίες	μg g ⁻¹ (ξηρό βάρος)
β-καροτένιο	7 – 12
Ασταξανθίνη	550
Κανταξανθίνη	362
Λουτεΐνη	52 – 3830
Χλωροφύλλη α	250 – 9630
Χλωροφύλλη β	72 – 5770
Φαιοφυτίνη α	2310 – 5640
Φαιοφυτίνη β	Μη διαθέσιμο
Βιολοξανθίνη	10 – 37

Αυτές οι χρωστικές ουσίες έχουν πολλαπλές θεραπευτικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική δράση, προστατευτική επίδραση έναντι του εκφυλισμού του αμφιβληστροειδούς, πρόληψη από χρόνιες ασθένειες (καρδιαγγειακές και καρκίνο του παχέος εντέρου) και ισχυροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Safi et al. 2014).

Έχουν γίνει πολλές έρευνες για την βελτίωση της εκχύλισης των χρωστικών χρησιμοποιώντας διαλύτες, όπως η ακετόνη, το εξάνιο, η αιθανόλη και το διχλωρομεθάνιο και εφαρμόζοντας εκχύλιση με υπερήχους, που έδειξαν καλή εκχύλιση των καροτενοειδών και των χλωροφυλλών (Safi et al. 2014).

3.2.Εφαρμογές

Η *Chlorella Vulgaris* παράγεται εμπορικά στην Ιαπωνία και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής. Στον Καναδά και στις Η.Π.Α. καταναλώνεται ως συμπλήρωμα για την υγεία (health supplement). Πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν αντικαρκινική δράση, ηπατο-προστατευτικές ιδιότητες, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αντιβακτηριακή δράση, αν και όλα αυτά, και ιδιαίτερα η αντικαρκινική δράση, είναι ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο (Plaza, Santoyo, Jaime, Avalo, Cifuentes, Reglero, García-Blairsy Reina, et al. 2012). Επίσης η *Chlorella Vulgaris* έχει εφαρμογές στις ζωοτροφές, στην επεξεργασία λυμάτων και στα βιοκαύσιμα (Safi et al. 2014). Η *Chlorella* παράγεται σε πάνω από 70 χώρες, με ετήσιες πωλήσεις της τάξης των 38 εκατομμυρίων δολαρίων και με ετήσια παραγωγή 2000 τόνων ξηρής βιομάζας (Se-Kwon Kim 2015)

Κεφάλαιο 4. *Haematococcus Pluvialis*

Ο *Haematococcus Pluvialis* είναι ένα μονοκύτταρο φύκος που ανήκει στο είδος Chlorophyta και στην οικογένεια Haematococcaceae. Βρίσκεται συνήθως σε περιοχές με εύκρατο κλίμα ανά τον κόσμο. Αυτός ο οργανισμός του γλυκού νερού έχει έναν ασυνήθιστο κύκλο ζωής, όπου είναι ικανό από μια κατάσταση φυτικού κυττάρου πλούσιο σε χλωροφύλλες και πρωτεΐνες να μεταβεί σε μια μορφή κύστης σε συνθήκες πίεσης. Σε αυτήν την μορφή ο *H. Pluvialis* περιβάλλεται από ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα και μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών, και ιδιαίτερα της ασταξανθίνης. Χάρη στην ικανότητά του, λοιπόν, να συσσωρεύει την πορτοκαλί-κόκκινη χρωστική ασταξανθίνη έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει αναγνωρισθεί ως η πρώτη φυσική πηγή αυτής της χρωστικής για εμπορική χρήση (Orosa et al. 2005).

4.1. Χημική Σύνθεση

Ο *Haematococcus Pluvialis* μπορεί να συσσωρεύει την ασταξανθίνη (15-30 mg ανά γραμμάριο ξηρού κυττάρου) και άλλα καροτενοειδή υπό διάφορες συνθήκες ανάπτυξης. Αυτά τα καροτενοειδή είναι η κύρια πηγή του κόκκινου ή κίτρινου χρώματος των πτερυγίων, του δέρματος και της σάρκας της άγριας πέστροφας, καθώς και διάφορων ειδών σολομού (Orosa et al. 2005). Ο *Haematococcus Pluvialis* παράγει 1,5-3% ασταξανθίνη από το ξηρό βάρος υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης. Οι έρευνες υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο συσσώρευσης ασταξανθίνης στον Αιματόκοκκο ως μια πηγή προστασίας από τον υψηλό φωτισμό και τις ρίζες οξυγόνου.

Η ασταξανθίνη είναι ένα φυσικά συντιθέμενο καροτενοειδές. Ως συμπλήρωμα διατροφής, έχει αντιγηραντική, αντιφλεγμονώδη, ηλιοπροστατευτική δράση και συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ασταξανθίνη είναι εμπορικά διαθέσιμη είτε προερχόμενη από χημική σύνθεση είτε από φυσικές πηγές, όπως τα μικροφύκη (Li et al. 2011).

Πολλές έρευνες προτείνουν ότι η ασταξανθίνη ξεπερνά τα αντιοξειδωτικά οφέλη του β-καροτενίου, της ζεαξανθίνης, της βιταμίνης C και E. Επί πλέον, φαίνεται να προστατεύει το δέρμα από τις βλαβερές συνέπειες της υπερϊώδους ακτινοβολίας, να ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, να αυξάνει τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας και να προστατεύει ενάντια στους χημικά προκληνόμενους καρκίνους. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει μία συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της πρόσληψης καροτενοειδών και της μείωσης της συχνότητας εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου και ορισμένων μορφών καρκίνου και αύξησης της αντοχής σε ιούς, βακτηριακές, μυκητιακές και παρασιτικές λοιμώξεις (Lorenz & Cysewski 2000).

4.2.Εφαρμογές

Το φύκος *Haematococcus* έχει εγκριθεί στην Ιαπωνία ως μια φυσική πηγή κόκκινου χρώματος για τα τρόφιμα και ως χρωστική ουσία για τις ιχθυοτροφές. Επίσης, έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την χρήση του ως συμπλήρωμα διατροφής και έχει εισαχθεί στην διατροφή πολλών ανθρώπων σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες. Οι κύριες εφαρμογές της φυσικής ασταξανθίνης που παράγεται από τον Αιματόκοκκο είναι στην υδατοκαλλιέργεια, στα συμπληρώματα διατροφής και στην φαρμακευτική. Ίσως, η μεγαλύτερη χρήση της είναι για τις τροφές των σαλμονοειδών. Η συνεχιζόμενη ανάπτυξη της καλλιέργειας σαλμονοειδών έχει δημιουργήσει τεράστια ζήτηση για χρωστικές ουσίες. Το χρώμα της σάρκας των σαλμονοειδών είναι το αποτέλεσμα της απορρόφησης ασταξανθίνης. Άλλη επιτυχημένη χρήση της φυσικής ασταξανθίνης αφορά τα πουλερικά και συγκεκριμένα τον χρωματισμό των κρόκων των αυγών. (Lorenz & Cysewski 2000).

Το 2005, κατασκευάστηκαν στην Ινδία και στις Η.Π.Α. βιομηχανικές εγκαταστάσεις για την παραγωγή *Haematococcus Pluvialis*, ως πηγή ασταξανθίνης, φτάνοντας τους 300 τόνους ξηρού βάρους ετήσιας παραγωγής. Η παγκόσμια αγορά για αυτήν την χρωστική εκτιμάται να φτάνει τα 200 εκατομμύρια δολάρια. Παρόλα αυτά, παραπάνω από το 95% της αγοράς κυριεύεται από την συνθετική μορφή της χρωστικής, που παράγεται από την DSM στην Ολλανδία, την BASF στην Γαλλία και την NHU στην Ινδία. Η ζήτηση των καταναλωτών, όμως, για φυσικά προϊόντα κάνει τις συνθετικές χρωστικές λιγότερο επιθυμητές και παρέχει την ευκαιρία για την παραγωγή φυσικής ασταξανθίνης από τον Αιματόκοκκο. Το εκτιμώμενο κόστος παραγωγής της είναι περίπου \$ 1.000 / kg και η τιμή αγοράς είναι πάνω από \$2500/kg. Πρόσφατα, νέες τεχνικές που αφορούν κλειστούς βιοαντιδραστήρες έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή φυσικής ασταξανθίνης από Αιματόκοκκο σε πολλές χώρες, όπως η Σουηδία και η Χαβάη. (Li et al. 2011; Lorenz & Cysewski 2000).

Κεφάλαιο 5. *Phaeodactylum Tricornutum*

Το φύκος *Phaeodactylum Tricornutum* είναι ένα διάτομο και αποτελεί το μόνο είδος από το γένος *Phaeodactylum* που μπορεί να υπάρχει σε διαφορετικές μορφές (οβάλ, ατρακτοειδές) και να αλλάζει το σχήμα των κυττάρων του με βάση τα περιβαντολογικά ερεθίσματα. Αυτό το διάτομο παρουσιάζει πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης σε βέλτιστες συνθήκες και αποτελεί μια σημαντική πηγή εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA).

Το *Phaeodactylum Tricornutum* βρίσκεται σε υφάλμυρα και θαλάσσια ύδατα σε όλο τον κόσμο και μπορεί εύκολα να καλλιεργηθεί. Έχει βρεθεί σε διάφορες περιοχές ανά τον κόσμο, και κατά κανόνα σε παράκτιες περιοχές με μεγάλες διακυμάνσεις της αλατότητας. Σε γενικές γραμμές, βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του είναι μεταξύ 15-25°C. Έχει διαπιστωθεί μάλιστα πως σε θερμοκρασίες άνω των 28°C συμβαίνει μια ξαφνική πτώση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του (PUFAs). Επίσης, σε τιμές pH άνω του 9 και κάτω του 5,5 έχει βρεθεί 75% μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Αντίθετα με τα περισσότερα διάτομα, το *Phaeodactylum Tricornutum* μπορεί να αναπτυχθεί απουσία πυριτίου. (Fajardo et al. 2007; Bitaubé Pérez et al. 2008).

5.1. Χημική Σύνθεση

Το φύκος *Phaeodactylum Tricornutum* περιέχει περίπου 36% ακατέργαστη πρωτεΐνη, 26% υδατάνθρακες, 18% λιπίδια και 16% τέφρα με βάση την ξηρή βιομάζα του. Είναι μια πλούσια πηγή κροτενοειδών, ειδικά της φυκοξανθίνης, η οποία έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιυπερτασικές και αντικαρκινικές δράσεις. Αυτή η χρωστική δεσμεύεται με διάφορες πρωτεΐνες και μαζί με την χλωροφύλλη α, σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεΐνης στα θυλακοειδή, που έχουν σημαντικό ρόλο στην φωτοσύνθεση (Kim et al. 2012).

Επίσης, το διάτομο αυτό έχει αναδειχθεί ως μια πιθανή πηγή ενέργειας. Αναπτύσσεται ραγδαία και αποθηκεύει λίπος περίπου 20-30% του ξηρού βάρους κυττάρων υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας. Ο περιορισμός αζώτου πορεί να προκαλέσει συσσώρευση λιπιδίων. Ο *Phaeodactylum Tricornutum* μπορεί να περιέχει γύρω στο 30-45% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, εκ των οποίων το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid, EPA) είναι το κυριότερο. Το EPA αποτελεί το 20-40% των ολικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και σε 100 gr ξηρής βιομάζας του διατόμου βρίσκονται περίπου 2,5 gr ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Το EPA είναι ένα σημαντικό λιπαρό οξύ για τον ανθρώπινο μεταβολισμό (Fajardo et al. 2007).

5.2. Εφαρμογές

Κατά την εμπορική χρήση του διατόμου αυτού, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ έχει συγκεντρώσει την προσοχή ως βασικό θρεπτικό συστατικό και ένα μεγάλος αριθμός ερευνών έχει επιδιώξει να αυξήσει την απόδοση της παραγωγής του (Kim et al. 2012).

Λόγω, λοιπόν του μεγάλου περιεχομένου του σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ, το διάτομο *Phaeodactylum Tricornutum* μπορεί να χρησιμοποιηθεί στους τομείς των τροφίμων, των φαρμακευτικών προϊόντων και των καλλυντικών. Τα υδατοδιαλυτά εκχυλίσματά του παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Επίσης, οι αντιβακτηριαδικές του δράσεις εξαρτώνται από τον μορφότυπό του. Για παράδειγμα, η ατρακτοειδής μορφή του έχει υψηλότερη αντιβακτηριδιακή δράση σε σχέση με τον οβάλ μορφότυπο, χάρη στο υψηλότερο περιεχόμενο του πρώτου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Kwak et al. 2014).

Αξίζει να σημειωθεί πως η χρήση του *Phaeodactylum Tricornutum* στην υδατοκαλλιέργεια είναι αμφιλεγόμενη γιατί οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να προκαλέσουν πολύ σημαντικές διαφοροποιήσεις στη βιοχημική σύσταση των κυττάρων του, και ως εκ τούτου στην θρεπτική τους αξία (Bitaubé Pérez et al. 2008). Το φύκος *Phaeodactylum Tricornutum*, όμως, αποτελεί ελκυστική επιλογή για την παραγωγή βιοντίζελ καθώς μεγαλώνει καλά αυτότροφα σε θαλασσινό νερό, παράγοντας σημαντικές ποσότητες τριακυλογλυκεριδίων (TAG). (Radakovits et al. 2011).

Κεφάλαιο 6. Ξήρανση

Γενικά, η αφυδάτωση είναι ένας σημαντικός παράγοντας στις χημικές βιομηχανίες τροφίμων. Ο βασικός στόχος της ξήρανσης είναι η απομάκρυνση του νερού στα στερεά, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η μικροβιακή ανάπτυξη και η αλλοίωση από τις χημικές αντιδράσεις και να βελτιωθεί η ποιότητα του προϊόντος. Επίσης, οδηγεί στην μείωση του βάρους και του όγκου των υλικών, κάτι που πρακτικά σημαίνει μείωση του κόστους μεταφοράς και αποθήκευσης (Oliveira et al. 2010). Η μέθοδος ξήρανσης επηρεάζει την ποιότητα, την γεύση, το χρώμα, την δομή και την ευπεπτότητα του τελικού προϊόντος και βέβαια, μια λανθασμένη τεχνική ξήρανσης μπορεί να οδηγήσει σε αμετάκλητη καταστροφή του προϊόντος, το οποίο δεν θα μπορεί να πωληθεί. Γίνεται κατανοητό, λοιπόν, πως η μέθοδος της ξήρανσης παίζει σπουδαίο ρόλο και πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη για το συγκεκριμένο προϊόν κάθε φορά. (Lin 1985)

Συγκεκριμένα, για την *Spirulina Platensis*, η ξήρανσή της αποτελεί περίπου το 30% του συνολικού κόστους παραγωγής και οι παραδοσιακές μέθοδοι που επεξεργάζονται την νωπή βιομάζα σε ξηρή είναι: ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), ηλιακή ξήρανση (solar drying), ξήρανση υπό κενό (vacuum drying), η συμβατική ξήρανση με θερμό αέρα (hot air drying) και η ατμοσφαιρική ξήρανση (atmospheric drying). Ο Sarada (1999) παρατήρησε απώλεια 50% περίπου της φυκοκυανίνης που περιείχε η βιομάζα της Σπιρουλίνας, όταν εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές ξήρανσής της, όπως η ξήρανση με ψεκασμό. Επίσης, ο Oliveira (2008) επισήμανε πως οι υψηλές θερμοκρασίες (>60°C) μειώνουν κατά πολύ το ποσό της εκχυλίσιμης φυκοκυανίνης (Oliveira et al. 2010).

6.1. Λυοφιλίωση (Κρυοξήρανση, Ξήρανση με κατάψυξη- Freeze Drying)

Η λυοφιλίωση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ξήρανση και τη βελτίωση της σταθερότητας διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και άλλων ευπαθών βιολογικών προϊόντων. Η λυοφιλίωση καταψύχει το υλικό και μειώνει την περιβάλλουσα πίεση για να επιτρέψει στο παγωμένο νερό που περιέχεται στο υλικό να περάσει από την στερεά φάση στην αέρια (εξάχνωση). Ο κύκλος της ξήρανσης με κατάψυξη μπορεί να διαιρεθεί σε τρία βήματα: την κατάψυξη (στερεοποίηση), την πρωτογενή ξήρανση (εξάχνωση πάγου) και την δευτερογενή ξήρανση (εκρόφηση του παγωμένου νερού) (Abdelwahed et al. 2006).

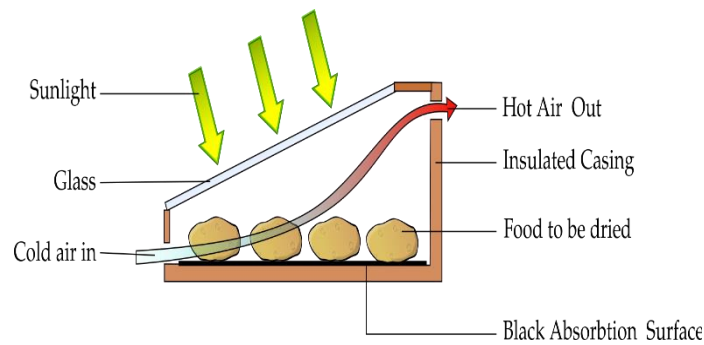
Τα πλεονεκτήματα αυτού του είδους της ξήρανσης είναι πάρα πολλά και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για τη βιομηχανική παραγωγή. Τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας απορρέουν από το γεγονός ότι η αφύγρανση γίνεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και τα σημαντικότερα είναι: η διατήρηση της βιολογικής αξίας, των βιταμινών, του αρχικού χρώματος, της γεύσης και του αρώματος των τροφίμων και των άλλων προϊόντων (φαρμάκων, ενζύμων), η

δυνατότητα παραγωγής νέων δομών και προϊόντων (π.χ. μικροεγκλεισμού (microencapsulation) βιολογικών μορίων), η διατήρηση του αρχικού όγκου των προϊόντων (δεν παρατηρείται συρρίκνωση-κατάρρευση της δομής) και η δημιουργία μεγάλου πορώδους. Το μεγάλο πορώδες με την σειρά του βοηθά στην ταχεία διεξαγωγή χημικών και άλλων αντιδράσεων στα αποξηραμένα προϊόντα και στην ταχεία επανενυδάτωση των αποξηραμένων προϊόντων (Abdelwahed et al. 2006).

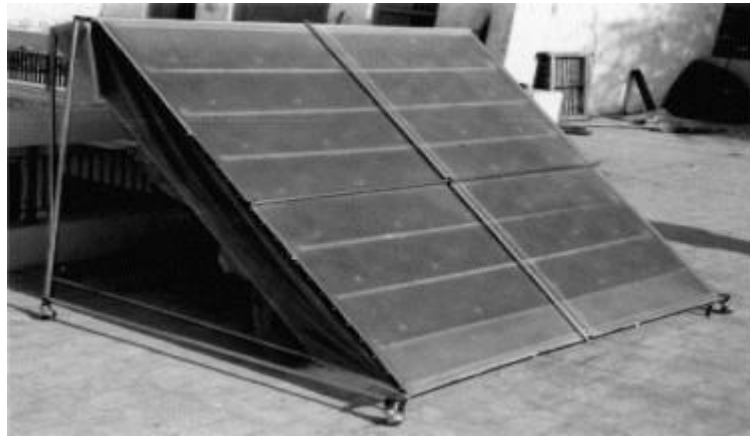
Βεβαίως, η μέθοδος παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, τα οποία αφορούν στο γεγονός ότι τα προϊόντα όταν επανενυδατώνονται είναι υδαρή και δεν αποκτούν την αρχική υφή/μηχανικές ιδιότητες του νωπού προϊόντος. Επιπλέον, αυτή η διαδικασία είναι σχετικά χρονοβόρα και δαπανηρή (πολύ μεγάλο κόστος και σημαντικές επενδύσεις σε εξοπλισμό, πολύ μεγάλο κόστος σε ενέργεια λόγω κατάψυξης των προϊόντων, κενού, κατάψυξης για την εξάχνωση και θέρμανσης). Για αυτό και εφαρμόζεται κυρίως για τα προϊόντα που έχουν υψηλή προστιθέμενη αξία (Abdelwahed et al. 2006).

6.2. Ηλιακή Ξήρανση (Solar Drying)

Η ηλιακή ξήρανση είναι μια τεχνική ξήρανσης που χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να αφυδατώσει διάφορες ουσίες και ιδιαίτερα τρόφιμα. Η ηλιακή ξήρανση χρησιμοποιείται για μικρές και μεσαίες ποσότητες σοδειάς. Ο τρόπος ξήρανσης είναι συνήθως άμεσος, δηλαδή με άμεση έκθεση του προϊόντος στην ηλιακή ακτινοβολία. Βεβαίως, η ξήρανση με την βοήθεια του ηλίου έχει πολλά μειονεκτήματα, με το σημαντικότερο να είναι η σοβαρή υποβάθμιση των τροφίμων, τόσο, ώστε πολλές φορές να γίνονται μη εδώδιμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα τρόφιμα μένουν απροστάτευτα από την βροχή, την σκόνη που μεταφέρεται από τον αέρα και από τις μολύνσεις από έντομα και μικρόβια. Επίσης, είναι μια αργή μέθοδος και επηρεάζεται πολύ από τις κλιματικές συνθήκες, οι οποίες μπορεί να μην είναι πάντα ευνοϊκές. Για παράδειγμα, εκτεταμένη ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί δυσμενή αποτελέσματα στην ποιότητα και οδηγεί σε απώλειες αιθέριων ελαίων αλλά και σε αλλαγές χρώματος στα υπό ξήρανση προϊόντα. Τα μεγάλα πλεονεκτήματα που προσφέρει, όμως, είναι αφενός η φιλικότητα προς το περιβάλλον και αφετέρου η μεγάλη οικονομία σε ενέργεια. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτό σε τροπικές χώρες. Παρά την απλότητα της διαδικασίας, όμως, και του μηδενικού κόστους ξήρανσης, βλέποντας τις ευαισθησίες που έχουν τα φύκη, συμπεραίνεται πως χρειάζεται μία μέθοδος ξήρανσης με όσο το δυνατόν ελεγχόμενες συνθήκες. Τα συστήματα ηλιακής ξήρανσης πρέπει να σχεδιάζονται κατάλληλα, ώστε να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις. (Diamante & Munro 1993; VijayaVenkataRaman et al. 2012). Το σύστημα και ο τρόπος της ηλιακής ξήρανσης παρουσιάζονται στις Εικόνες 7 και 8.



Εικόνα 7. Σύστημα ηλιακής ξήρανσης



Εικόνα 8. Εξοπλισμός ηλιακής ξήρανσης

6.3. Επαγωγική Ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα (Hot Air drying)

Η μέθοδος αυτή λειτουργεί με την εφαρμογή θερμού αέρα, ο οποίος αυξάνει την κινητήρια δύναμη για την μεταφορά μάζας και επιταχύνει την ξήρανση. Επίσης, μειώνει την σχετική ατμοσφαιρική υγρασία, αυξάνοντας περαιτέρω την κινητήρια δύναμη της ξήρανσης. Καθώς το περιεχόμενο σε υγρασία πέφτει, τα στερεά θερμαίνονται και οι αυξημένες θερμοκρασίες επιταχύνουν την διάχυση του νερού από το εσωτερικό του στερεού στην επιφάνεια. Η αύξηση της θερμοκρασίας περιορίζεται από τις απαιτήσεις για την ποιότητα του προϊόντος. Αυτή η τεχνική έχει μειονεκτήματα, καθώς οι θερμοκρασίες μπορούν να ξεπεράσουν τους 60°C και ο υπερβολικά θερμός αέρας να αφυδατώσει ολοκληρωτικά την επιφάνεια, ώστε οι πόροι του τροφίμου να συρρικνωθούν και να κλείσουν. Αυτό οδηγεί στον σχηματισμό κρούστας που είναι ανεπιθύμητος. Επίσης, έχει χαμηλή ενεργειακή απόδοση και είναι σχετικά αργή. Τέλος, λόγω της μεγάλης διάρκειας ξήρανσης και της υπερθέρμανσης της επιφάνειας, προκύπτουν προβλήματα αλλαγής στο χρώμα (πιο σκούρο), απώλειας γεύσης και κυρίως υποβάθμισης των θρεπτικών. Αυτό έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο σε τρόφιμα υψηλής αξίας, όπως τα φύκη, τα οποία έχουν θερμοευαίσθητες θρεπτικές ουσίες. Βέβαια, το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι είναι σχετικά φθηνή (Giri & Prasad 2007; Orikasa et al. 2014).

6.4. Ξήρανση Υπό Κενό (Vacuum Drying)

Η ξήρανση κενού χρησιμοποιείται για να ξηράνει θερμοευαίσθητα προϊόντα, όπως τα φύκη, καθώς η εξάτμιση του νερού εξελίσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση υποπίεσης, στην περιοχή μεταξύ 10 και 50 hPa, η οποία χαμηλώνει το σημείο βρασμού των υγρών σε θερμοκρασίες κοντά σε αυτές του δωματίου. Η θερμότητα παρέχεται με αγωγή και η θερμοκρασία του προϊόντος μπορεί εύκολα να ελεγχθεί. Η επαφή με τον αέρα αποφεύγεται, σε αντίθεση με την προηγούμενη μέθοδο. Λόγω της μοριακής μεταφοράς του εξατμισμένου νερού, η διαδικασία είναι μακριά και μπορεί να διαρκέσει έως 24 ώρες. Η διάρκεια της ξήρανσης μπορεί να μειωθεί με την εφαρμογή συστήματος ρύθμισης της πίεσης (pressure-regulatory system). Τέλος, τα τρόφιμα που ξηραίνονται με την ξήρανση υπό κενό είναι πολύ καλής ποιότητας διότι όλες οι θρεπτικές τους αξίες διατηρούνται αποτελεσματικά, χάρη στις χαμηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται (Lewicki 2006; Orikasa et al. 2014).

Κεφάλαιο 7. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)

Τα μικροφύκη προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες ως πηγές φυσικών ουσιών, που είναι ευεργετικές για την υγεία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Έτσι, έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή από τις βιομηχανίες τροφίμων. Αυτό απαιτεί, βέβαια, την άμεση κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο, για αυτό και η τεχνική της εκχύλισης είναι εξαιρετικά σημαντική, όσον αφορά την κατάλληλη τεχνολογία που θα εφαρμοστεί. Επίσης, είναι σημαντικό να εφαρμόζονται μέθοδοι φιλικές προς το περιβάλλον, αλλά και με αυξημένη παραγωγικότητα (Rostagno et al. 2003; Macías-Sánchez et al. 2009). Με αυτήν την έννοια νέες τεχνικές, όπως η εκχύλιση με υπερήχους, κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος (Macías-Sánchez et al. 2009).

Συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, η εκχύλιση με υπερήχους είναι μια καλή τεχνική και αυτό οφείλεται στην υψηλή αποτελεσματικότητα και αποδοτικότητά της, στις μικρές ενεργειακές απαιτήσεις, στην χαμηλή κατανάλωση διαλύτη, στον μειωμένο χρόνο εκχύλισης, στην ενίσχυση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και στην μείωση της πιθανότητας φυσικών και χημικών κινδύνων. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί συστηματικά για την εκχύλιση ουσιών με χαμηλό μοριακό βάρος και βιοδραστικών ενώσεων από φυτά και ζώα. Η βελτίωση της διαδικασίας της εκχύλισης χρησιμοποιώντας υπερήχους σχετίζεται με την καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων, την μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και την ενίσχυση της μεταφοράς μάζας από το κυτταρικό τοίχωμα (Macías-Sánchez et al. 2009).

Οι υπερήχοι, επίσης, επιτρέπουν μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη μέσα στο δείγμα και αυξάνουν την επιφάνεια επαφής μεταξύ υγρής και στερεής φάσης. Αυτά, σε συνδυασμό με την αυξημένη μεταφορά μάζας και την σημαντική διάσπαση των κυττάρων, μέσω της σπηλαίωσης, που θα αναφερθεί παρακάτω, αυξάνει την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού προϊόντος (intracellular product) στο κύριο μέρος του μέσου (bulk medium) (Rostagno et al. 2003).

Εξ' ορισμού οι υπερήχοι συνιστούν κύματα υψηλής συχνότητας που μεταφέρουν πίεση κατά τη διέλευσή τους σε ένα μέσο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών χαμηλής και υψηλής πίεσης. Η διακύμανση αυτή της πίεσης αναφέρεται ως πλάτος πίεσης (amplitude) και είναι ανάλογη της ποσότητας ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα. Στην περίπτωση που οι διακυμάνσεις της πίεσης είναι αρκετά υψηλές (3.000 MPa), τότε ένα υγρό μέσο μπορεί να αποδομηθεί και να σχηματίζονται και συμπιέζονται μικροφουσαλίδες αερίου και ατμού. Η αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας από την συμπύκνωση οδηγεί στην διάσπαση της φουσαλίδας. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως σπηλαίωση (cavitation), ενώ οι φουσαλίδες είναι δυνατόν να διασπώνται και να επαναδημιουργούνται συνεχώς επιφέροντας αλλαγές στη δομή του μέσου που υφίσταται την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων.

Συχνά, η βίαιη κατάρρευση που συμβαίνει λόγω της μεταβατικής αυτής επαναλαμβανόμενης σπηλαίωσης μπορεί να επιφέρει ένα μεγάλο αριθμό χημικών μεταβολών είτε στο εσωτερικό των φυσαλίδων ατμού, είτε στη διεπιφάνεια με το υγρό μέσο. Με την κατάρρευση μίας τέτοιας φυσαλίδας δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες και παρουσία νερού, σχηματίζονται πρωτογενείς ελεύθερες ρίζες H και OH, οι οποίες ανασυνδιαζόμενες μπορούν να οδηγήσουν αλυσιδωτά σε δευτερογενή προϊόντα ελευθέρων ριζών, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να επιδράσουν χημικά διασπώντας δισουλφυδικούς δεσμούς πρωτεϊνών, να επηρεάσουν το βαθμό υδροξυλίωσης μακρομορίων αυξάνοντας την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Η επίδραση αυτή μπορεί να είναι και αρνητική κατά την επεξεργασία ενός τροφίμου, όπως συμβαίνει κατά τις αντιδράσεις πυρόλυσης που πραγματοποιούνται από την εκτεταμένη χρήση υπερήχων σε τρόφιμα που περιέχουν οργανικούς διαλύτες (π.χ.γάλα) και προσδίδουν στο τρόφιμο τη γεύση και το άρωμα ελαστικού. Ωστόσο η χημική επίδραση των υπερήχων περιορίζεται σε ένα αρκετά υψηλό εύρος συχνοτήτων (200-500 kHz) και δεν αποτελεί το κυρίαρχο φαινόμενο σε χαμηλότερες συχνότητες που χρησιμοποιούνται σε διάφορες διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων.

Κεφάλαιο 8. *Spirulina Platensis*

8.1. Υλικά

Η *Spirulina Platensis* παραλήφθηκε από μονάδες ανοικτής καλλιέργειας (open pond) στη Νιγρίτα Σερρών σε υγρή μορφή (διάλυμα πάστας) με έντονο πράσινο χρώμα και ποσοστό υγρασίας $88,84 \pm 4,42\%$. Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό, η αιθανόλη, η ακετόνη και το εξάνιο παραλήφθηκαν από την εταιρία Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο). Η ρίζα 2,2-διφαινυλο-πικρυλ υδραζύλιο (DPPH) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich.

8.2. Μέθοδοι

8.2.1. Ξήρανση

Το φύκος *Spirulina Platensis* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα βρισκόταν σε υγρή μορφή. Για την καλύτερη μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι ξήρανσης, οι οποίες είναι:

- Ατμοσφαιρική ξήρανση

Λεπτά στρώματα Σπιρουλίνας πάχους μέχρι 0,5 εκατοστά σε αλουμινένια ταψάκια μεταφέρθηκαν στον απαγωγό για 72 ώρες σε όσο το δυνατόν σταθερότερες συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας ($T = 20 \pm 4^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\% \text{ RH}$). Καθόλη τη διάρκεια των 72 ωρών οι απαγωγοί παρέμεναν ερμητικά κλειστοί ώστε να αποφεύγεται η απευθείας επαφή της βιομάζας με το ηλιακό φως και να μην διαταράσσονται οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας στο εσωτερικό αυτού. Για τον συνεχή έλεγχο της θερμοκρασίας και της υγρασίας είχαν τοποθετηθεί εντός του απαγωγού ηλεκτρονικό θερμόμετρο και υγρόμετρο.

- Ξήρανση υπό κενό

Λεπτά στρώματα Σπιρουλίνας πάχους 1-2 χιλιοστών τοποθετήθηκαν σε ειδικούς περιέκτες και παρέμειναν στον ξηραντήρα κενού (Gallenkamp 220V, 1000W) για 270 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C και για 90 min σε θερμοκρασία 50°C .

- Λυοφιλίωση

Η πειραματική εγκατάσταση αποτελούταν από:

1. Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη (Freeze Drying Plant GT2 της Leybold – Heraeus-Εικόνα 9) η οποία περιελάμβανε:

- ✓ Θάλαμο τοποθέτησης δειγμάτων στον οποίο πραγματοποιείται η ξήρανση υπό συνθήκες ελαττωμένης πίεσεως.
 - ✓ Συμπυκνωτήρα με ψυκτικό κύκλωμα για τη συμπύκνωση και κατάψυξη των υδρατμών, που προέρχονται από τη ξήρανση των δειγμάτων.
 - ✓ Θερμαινόμενες πλάκες με αντιστάσεις για τη θέρμανση των προς ξήρανση δειγμάτων.
 - ✓ Βαλβίδες εξαερισμού του θαλάμου ξήρανσης
 - ✓ Βαλβίδα επικοινωνίας θαλάμου ξήρανσης με τον χώρο του ψυκτικού κυκλώματος
2. Αντλία λαδιού (Edwards της Trivac) για τη δημιουργία ελαττωμένης πίεσεως στο θάλαμο ξήρανσης
3. Θερμοστοιχείο κατάλληλα συνδεδεμένο με καταγραφικό θερμοκρασίας για τη μέτρηση της θερμοκρασίας του δείγματος κατά τη διάρκεια της ξήρανσης.

Πειραματική διαδικασία:

1. Τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -30°C για 48 ώρες
2. Απομακρύνθηκαν τα τυχόν υπολείμματα νερού από τους σωλήνες της συσκευής.
3. Ο θάλαμος ξήρανσης τέθηκε σε επικοινωνία με τον χώρο κατάψυξης.
4. Τέθηκε σε λειτουργία η ψυκτική μηχανή της συσκευής για τη πρόψυξη του συμπυκνωτήρα ατμών.
5. Τα προς ξήρανση δείγματα τοποθετήθηκαν εντός του θαλάμου ξήρανσης.
6. Το θερμοστοιχείο τέθηκε σε επαφή με ένα από τα δείγματα.
7. Τοποθετήθηκε το κάλυμμα του θαλάμου ξήρανσης και αφού έκλεισαν οι βαλβίδες εξαερισμού ξεκίνησε η διεργασία της ξήρανσης με την εκκίνηση της αντλίας κενού.
8. Ο χρόνος ξήρανσης μετρήθηκε από τη στιγμή που η πίεση στο θάλαμο ξήρανσης έγινε μικρότερη του 1 Torr (1,33 mbar)
9. Η ξήρανση διήρκεσε 6 ώρες και πραγματοποιήθηκε υπό πίεση 0,06 mbar. Η θερμοκρασία του δείγματος γι' αυτή την πίεση ήταν κοντά στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης των προς ξήρανση υλικών. Η επιθυμητή πίεση επιτυγχανόταν με κατάλληλη ρύθμιση των βαλβίδων εισόδου του αέρα.



Εικόνα 9. Συσκευή Λυοφιλίωσης

- Βιομηχανική Ξήρανση

Λεπτά στρώματα Σπιρουλίνας πάχους 1-2 χιλιοστών απλώθηκαν σε τραπέζια λαμαρίνας και παρέμειναν σε θερμοκήπιο χαμηλού ύψους για τρεις ώρες, με την θερμοκρασία να κυμαίνεται στους 60°C.

- Ηλιακή ξήρανση

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μονάδα γήρανσης των υλικών του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών. Στη μονάδα γήρανσης πραγματοποιήθηκε επιταχυνόμενη ηλιακή ξήρανση υπό έξι λαμπτήρες ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας (Osram Ultra Vitalux, 300W, 230V) (Εικόνα 10). Τα δείγματα ήταν τοποθετημένα υπό ψύξη στους -30 °C και πριν την έναρξη της ξήρανσης αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, καθένα από τα δείγματα τοποθετήθηκε σε ειδικούς περιέκτες και μεταφέρθηκε στη μονάδα γήρανσης υλικών ώστε να ξεκινήσει η ξήρανση.



Εικόνα 10. Μονάδα ηλιακής ξήρανσης

8.2.2. Εκχύλιση

Τα δείγματα της νωπής και της ξηρής Σπιρουλίνας εκχυλίστηκαν με την μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες: νερό, αιθανόλη, ακετόνη και εξάνιο. Οι εκχυλίσεις με υπέρηχους διεξήχθησαν στο λουτρό υπερήχων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China). Τα δείγματα (ξηρό βάρος: 2,5 gr) τοποθετούνταν στο δοχείο εκχύλισης (beaker) μαζί με τον διαλύτη (50 ml), με αναλογία στερεού/διαλύτη: 1 gr ξηρής βιομάζας /20 ανά ml διαλύτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε συχνότητα 25 kHz, στα 450 Watt και σε θερμοκρασία 30 °C και διαρκούσαν 5 min.

Περίληπτικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, οι συνθήκες εκχύλισης, καθώς και οι βιοδραστικές ενώσεις, των οποίων το περιεχόμενο αξιολογήθηκε, παρουσιάζονται για το μικροφύκος *Spirulina Platensis* στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος *Spirulina platensis* (SP)

Μικροφύκος	Διαλύτες	Συνθήκες Εκχύλισης	Βιοδραστικές Ουσίες
<i>Spirulina platensis</i> (SP)	Νερό Αιθανόλη Ακετόνη Εξάνιο	25 kHz 50 ml διαλύτη Ξηρό Βάρος SP:2,5 g 450 W 50%P t=5 min	Ολικά Καροτενοειδή Χλωροφύλλες Β- καροτένιο Φυκοκυανίνη

Η απόδοση της εκχύλισης εκφράστηκε ως ποσοστό του ξηρού βάρους του εκχυλίματος που αποκτήθηκε προς το ξηρό βάρος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Απόδοση Εκχύλισης % = (Ξηρό Βάρος Εκχυλίματος / Ξηρό Βάρος Δείγματος) * 100%

8.2.3. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου

8.2.3.1. Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών

Το περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου Jeffrey (Jeffrey et al. 1997)

Συγκεκριμένα, 50 mg στερεού δείγματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου, όπου προστίθενται 5 ml ακετόνης 90%. Το δείγμα ομογενοποιείται στο vortex και αφήνεται για 24 ώρες στους -18°C. Ύστερα, ομογενοποιείται ξανά στο vortex και φυγοκεντρείται για 10 min στις 3000 στροφές, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινη κυψελίδα φωτόμετρου και μετράται η απορρόφησή του. Πριν από κάθε δείγμα, μετράται η απορρόφηση της ακετόνης 90% που χρησιμοποιείται ως τυφλό. Τα μήκη κύματος που ενδιαφέρουν είναι:

- 750 nm: γίνεται έλεγχος αν η απορρόφηση είναι μηδενική
- 664, 647, 630 nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες
- 510, 480 nm: μήκη κύματος που απορροφούν τα καροτενοειδή

Στην συνέχεια, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας με την χρήση των παρακάτω εξισώσεων:

$$Ca \text{ (}\mu\text{g/L)} = 11,85(A_{664}) - 1,54(A_{647}) - 0,08(A_{630}) \quad \text{Εξ. 1}$$

$$Cb \text{ (}\mu\text{g/L)} = 21,03(A_{647}) - 5,43(A_{664}) - 2,66(A_{630}) \quad \text{Εξ. 2}$$

$$Cc \text{ (}\mu\text{g/L)} = 24,52(A_{630}) - 1,67(A_{664}) - 7,60(A_{647}) \quad \text{Εξ. 3}$$

$$Cp \text{ (}\mu\text{g/L)} = 7,60(A_{480}) - 1,49(A_{510}) \quad \text{Εξ. 4}$$

Η εξίσωση 1 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης A, η Εξίσωση 2 για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης B, η Εξίσωση 3 για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης Γ, ενώ η Εξίσωση 4 για τον υπολογισμό των ολικών καροτενοειδών.

8.2.3.2. Προσδιορισμός β-καροτενίου

Το περιεχόμενο σε β-καροτένιο εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου των Ben Amotz & Avron 1983 (Ben-Amotz & Avron 1983).

Πιο αναλυτικά, 50 mg στερεού δείγματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου, όπου προστίθενται 5 ml ακετόνης 80%. Το δείγμα ομογενοποιείται στο vortex και συντηρείται στο ψυγείο κατά την διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, ομογενοποιείται ξανά στο vortex και φυγοκεντρείται για 25 min στις 2500 στροφές, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινη κυψελίδα φωτόμετρου και μετράται η απορρόφησή του στα 480 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται η ακετόνη 80%. Η συγκέντρωση του β-καροτενίου υπολογίζεται από τον νόμο του Beer, εξίσωση 5.

$$C = A/\epsilon l \text{ (mol/l)} \quad \text{Εξ.5}$$

Όπου: A: απορρόφηση στα 480 nm

ε: συντελεστής απόσβεσης / $\epsilon = 2273$ για τα 480 nm για το β-καροτένιο (Ben Amotz & Avron 1983)

l: η απόσταση που διανύει η δέσμη φωτός (1 cm)

8.2.3.3. Προσδιορισμός φυκοκυανίνης

Το περιεχόμενο σε φυκοκυανίνη εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου των Boussiba & Richmond 1980 (Boussiba & Richmond 1980).

Συγκεκριμένα, 10 mg στερεού δείγματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου, όπου προστίθενται 10 ml 100 mM φωσφορικού buffer (phosphate buffer). Το δείγμα ομογενοποιείται στο vortex και συντηρείται στο ψυγείο για μια νύχτα. Την επόμενη ημέρα, ομογενοποιείται στο vortex και φυγοκεντρείται για 5 min στις 5000 στροφές. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινη κυψελίδα φωτόμετρου και μετράται η απορρόφησή του στα 620 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται το buffer. Η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης επί τις εκατό της ξηρής βιομάζας υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης 6.

$$\text{C-Phycocyanin (PC): \% pure C-PC} = [A_{620} \times (10 \text{ ml}) \times (100)] / 7.3 \times (\text{mg sample}) \times (\% \text{dw}) \quad \text{Εξ.6}$$

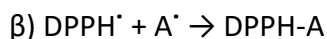
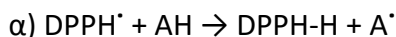
Όπου: A: απορρόφηση στα 620 nm

Dw: ξηρό βάρος

8.2.3.4. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης με Dpph

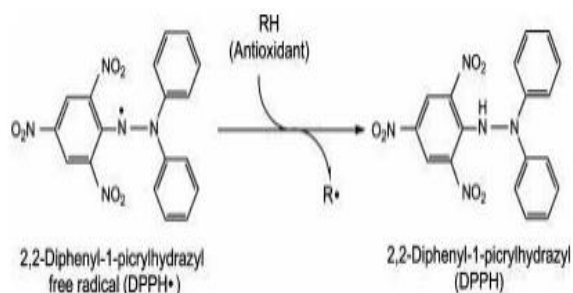
Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH•) (Brand-Williams et al. 1995). Η πρότυπη μέθοδος DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) είναι μια απλή και ευαίσθητη μέθοδος

προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών προϊόντων. Το DPPH[•] είναι μία σταθερή ρίζα, η οποία παρουσιάζει μία έντονη απορρόφηση στα 515 nm στο φάσμα του ορατού και αντιδρά με ενώσεις που δίνουν άτομα υδρογόνου. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αντιδρά με την ρίζα του DPPH[•] α) δίνοντάς του ένα υδρογόνο, ή β) με το να δεσμεύεται πάνω σε αυτήν:



Έτσι, παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 515 nm, μπορούμε να παρακολουθήσουμε την καταστροφή της ρίζας DPPH[•] (εικόνα 11).

Κατά την αντίδραση αναγωγής αποχρωματίζεται το βαθύ μωβ μεθανολικό διάλυμα DPPH[•]. Όσο πιο έντονος είναι ο αποχρωματισμός του μεθανολικού διαλύματος DPPH[•] τόσο χαμηλότερη είναι η απορρόφηση του μίγματος αντίδρασης και αποτελεσματικότερη η απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών.



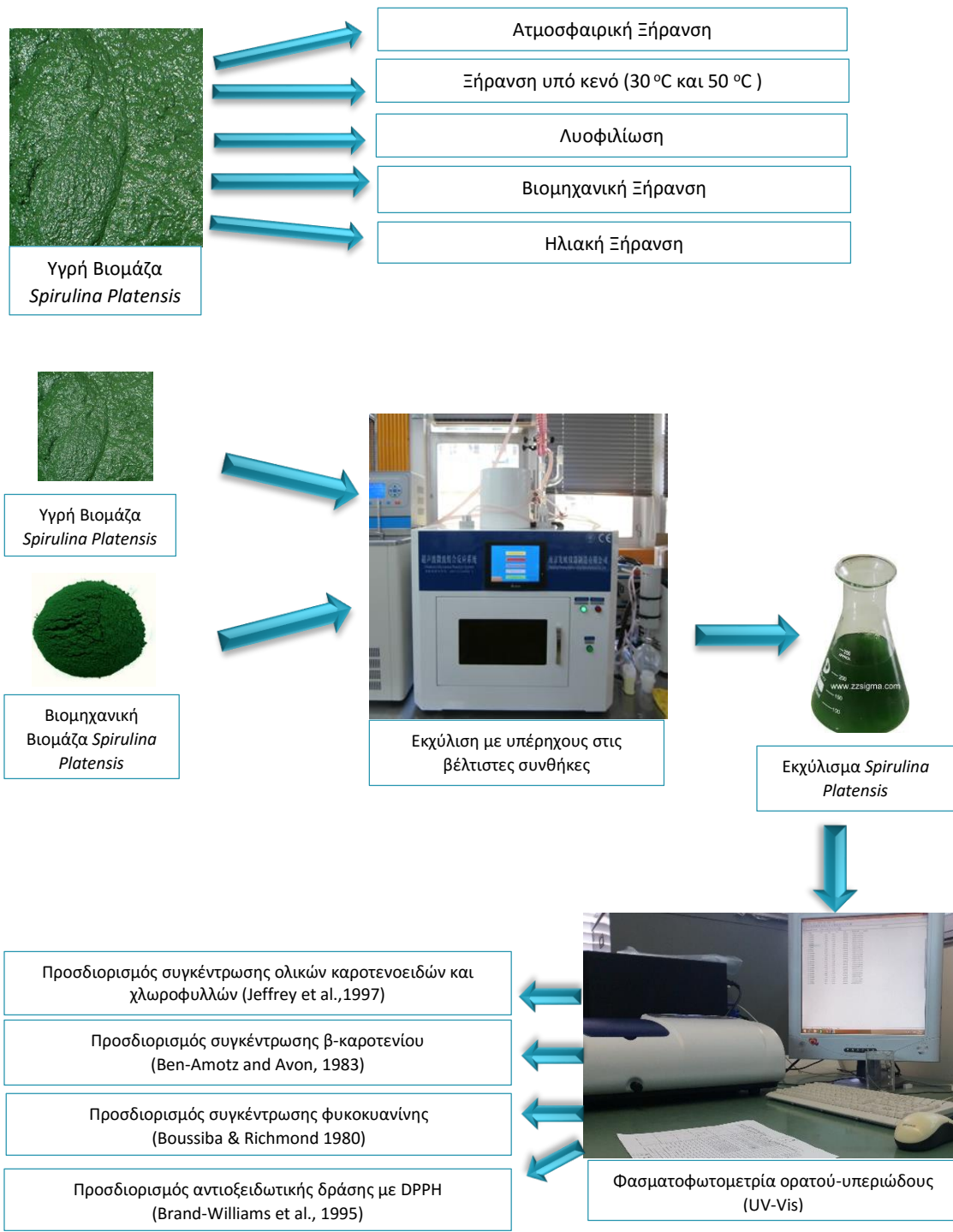
Εικόνα 11. Η μετατροπή της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] σε DPPH από μια αντιοξειδωτική ένωση

Εν συντομία, 0,003 gr δραστικής ρίζας 2,2- διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH) προστέθηκαν σε 100 ml μεθανόλης και το διάλυμα αναδεύτηκε για 15 min. Σε μία κυψελίδα τοποθετήθηκαν 0,1 ml του εξεταζόμενου εκχυλίσματος (αντιοξειδωτικό) και 3,9 ml του διαλύματος μεθανόλης-ρίζας DPPH (οξειδωτικό). Το UV-Vis φασματοφωτόμετρο (Bel Photonics UV-M51) χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η απορρόφηση στα 515 nm μετά από 5, 10, 20, 30, 40, 50 και 60 min για τα εκχυλίσματα και μετά από 5, 10, 20 και 30 min για τα υπολείμματα των εκχυλίσεων. Η ικανότητα απενεργοποίησης των ελευθέρων ριζών (RSA), όπως ερμηνεύτηκε από τον αποχρωματισμό του διαλύματος DPPH[•] υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{RSA} = 100 \times (1 - \text{AE} / \text{AD}) \quad \text{Εξ.7}$$

Όπου: AE είναι η απορρόφηση του μίγματος της αντίδρασης που περιέχει το εκχύλισμα του δείγματος ή του προτύπου αντιοξειδωτικού και AD είναι η απορρόφηση του διαλύματος DPPH[•] μόνο.

Συγκεντρωτικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το μικροφύκος της *Spirulina Platensis* παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 2. Διάγραμμα Ροής Διεργασιών που ακολουθήθηκαν κατά την επεξεργασία της βιομάζας της *Spirulina Platensis*

8.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

8.3.1 Επίδραση της Ξήρανσης στα Βιοδραστικά Χαρακτηριστικά

Τα δείγματα της υγρής Σπιρουλίνας βρίσκονταν σε διάλυμα πάστας με έντονο πράσινο χρώμα και ποσοστό υγρασίας $88,84 \pm 4,42\%$.

Μετά την ατμοσφαιρική ξήρανση, τα δείγματα λήφθηκαν σε μορφή φιλμ με εμφανώς αλλαγμένο χρώμα (μπλε) και τελική υγρασία $10,31 \pm 0,52\%$.

Μετά την εφαρμογή της λυοφιλίωσης (ξήρανση με κατάψυξη), τα δείγματα είχαν μπλε-πράσινο χρώμα, ήταν αφράτα σε μορφή σκόνης και θρυμματίζονταν εύκολα. Η περιεχόμενη υγρασία ήταν $9,90 \pm 0,04\%$.

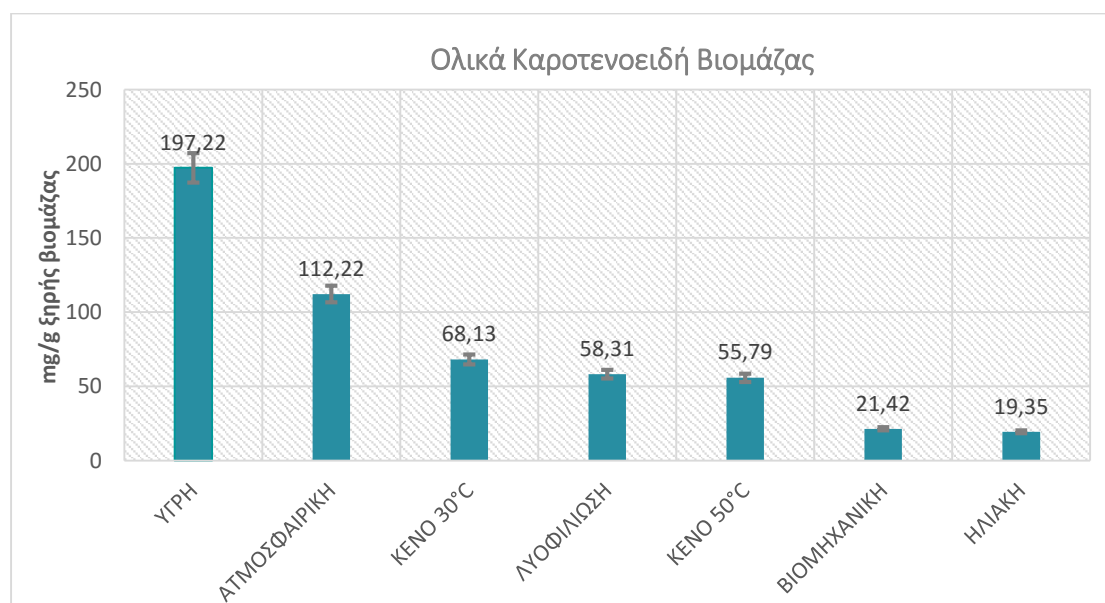
Τα δείγματα της Σπιρουλίνας που υπέστησαν βιομηχανική ξήρανση, παραλήφθηκαν από την βιομηχανία με ανοιχτό πράσινο χρώμα, ενώ το περιεχόμενο σε υγρασία βρέθηκε να είναι της τάξης του $8,29 \pm 0,42\%$.

Τέλος, η ηλιακή ξήρανση έδωσε πολύ σκληρά δείγματα σε μορφή νιφάδων και με πολύ σκούρο χρώμα (καφέ προς μαύρο) και αυτό γιατί οι πρωτεΐνες της είχαν μετουσιωθεί και οι πολυσακχαρίτες της είχαν καεί. Η περιεχόμενη υγρασία είχε την χαμηλότερη τιμή από όλες τις μεθόδους ($1,35 \pm 0,07\%$).

Πέρα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, πρέπει όμως, να μελετηθεί και η αλλαγή που επιφέρει η κάθε μέθοδος ξήρανσης στο περιεχόμενο σε βιοδραστικές ενώσεις.

8.3.1.1. Ολικά καρροτενοειδή

Οι μετρήσεις των ολικών καρροτενοειδών της Σπιρουλίνας για τις διάφορες ξηράνσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1 Συγκέντρωση Ολικών Καρροτενοειδών των διαφόρων ειδών Βιομάζας *Spirulina Platensis*

Παρατηρώντας το διάγραμμα, γίνεται εύκολα κατανοητό πως η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον τρόπο ξήρανσης και αντιστρόφως ανάλογη της θερμοκρασίας που εφαρμόζεται κάθε φορά.

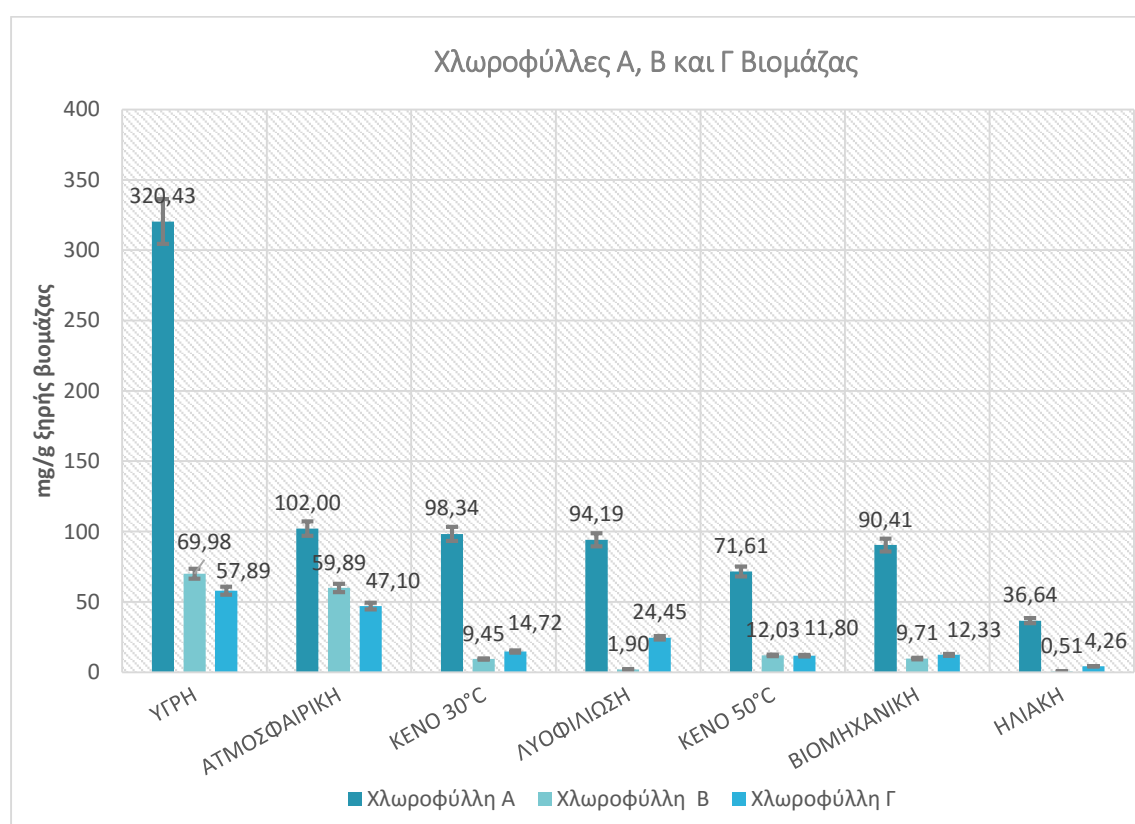
Όπως ήταν αναμενόμενο, την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικά καροτενοειδή έχει η νωπή Σπιρουλίνα και αυτό, γιατί σε αυτήν την περίπτωση, η βιομάζα είναι αυτούσια και δεν υπάρχει καμία επεξεργασία, σε αντίθεση με τις επόμενες περιπτώσεις. Ακολουθεί η Σπιρουλίνα που έχει υποστεί ατμοσφαιρική ξήρανση, δηλαδή την πιο ήπια επεξεργασία εκ των μεθόδων ξήρανσης. Στην ατμοσφαιρική ξήρανση εφαρμόζονται κανονικές συνθήκες και θερμοκρασίες δωματίου, κάτι που σημαίνει πως δεν ξεπερνιούνται οι 25°C. Έτσι, οι χρωστικές και συγκεκριμένα τα καροτενοειδή διατηρούνται. Η αμέσως λιγότερο ήπια ξήρανση, δηλαδή η ξήρανση υπό κενό στους 30°C, είναι αυτή που εμφανίζεται αμέσως μετά στο διάγραμμα και φανερώνει πως μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας κατά την ξήρανση (περίπου 5-10°C) μπορεί να προκαλέσει μείωση της τάξης σχεδόν 40% στην συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών του κυανοβακτηρίου που μελετάται. Ακολούθως, η λυοφιλίωση και η ξήρανση υπό κενό στους 50 °C φαίνεται να έχουν σχεδόν ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά και μικρές διαφορές με την προηγούμενη μέθοδο της ξήρανσης υπό κενό στους 30°C. Η μικρή διαφορά των περίπου 12 mg/g οφείλεται στην διαφορά θερμοκρασίας των 20°C, ανάμεσα στις δύο ξηράσεις υπό κενό. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, πως μεταφερόμενη από την θερμοκρασία δωματίου (ατμοσφαιρική ξήρανση) στους 30°C (ξηρανση υπό κενό) η διαφορά στην συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών στην Σπιρουλίνα είναι πολύ σημαντική, ενώ μεταφερόμενη από τους 30°C στους 50°C, η διαφορά είναι σχεδόν αμελητέα. Όσον αφορά την λυοφιλίωση (κρυοξηρανση), σύμφωνα με τον An-Erl King, το πορώδες και η επιφάνεια των λυοφιλιωμένων προϊόντων είναι μεγαλύτερα από αυτά των προϊόντων που έχουν ξηρανθεί με άλλες μεθόδους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της οξειδωσής τους εξαιτίας της έκθεσης μεγαλύτερης επιφάνειας (An-Erl King et al. 2001). Έτσι εξηγείται και η σχετικά χαμηλή συγκέντρωση καροτενοειδών με αυτό το είδος ξήρανσης. Προχωρώντας στην βιομηχανική ξήρανση, παρατηρείται μεγάλη απώλεια καροτενοειδών, κάτι που είναι δικαιολογημένο, αν αναλογιστεί κανείς πως η θερμοκρασία που εφαρμόζεται μπορεί να ξεπεράσει τους 60°C. Τελευταία βρίσκεται η ηλιακή ξήρανση, η πιο έντονη μέθοδος που καταπονεί πολύ τα μικροφύκη και καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά τους λόγω των πολύ υψηλών θερμοκρασιών. Συγκρινόμενη με την αμέσως προηγούμενη, δηλαδή την βιομηχανική ξήρανση, φαίνεται μια μικρή διαφορά στις συγκεντρώσεις τους που αποδίδεται στο γεγονός, ότι στη βιομηχανική ξήρανση το μικροφύκος δεν βρίσκεται άμεσα σε τόσο έντονο φωτισμό, όπως στην ηλιακή ξήρανση, και άρα οι συνθήκες είναι πιο ελεγχόμενες.

Αναλύοντας τις μετρήσεις των ολικών καροτενοειδών του Διαγράμματος 1, συμπεραίνεται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία της ξήρανσης και επομένως η μέθοδος γίνεται πιο επίτονη για το μικροφύκος που εξετάζεται, τόσο μεγαλύτερη είναι η απώλεια των ολικών καροτενοειδών και η υποβάθμιση της ποιότητας και της διατροφικής αξίας του προϊόντος. Αυτό εξηγείται και βιβλιογραφικά, με τον S. Sogi να αναφέρει ότι οι ξηραντήρες που λειτουργούν σε υψηλές θερμοκρασίες

παρουσιάζουν πτωτικές τάσεις στην συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών (Sogi et al. 2015). Είναι γνωστό πως τα καροτενοειδή είναι θερμοευαίσθητες ενώσεις και αυτό αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα των μετρήσεων, όπου η απώλειά τους φτάνει περίπου το 90% στην ηλιακή ξήρανση. Όπως αναφέρει άλλωστε και ο A. Vonshak, η υπερβολική ξήρανση (overdrying) της Σπιρουλίνας συχνά οδηγεί σε απώλεια βασικών στοιχείων, όπως οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή (Vonshak 1997).

Όπως έχει προαναφερθεί, εκτός από καροτενοειδή, το κυανοβακτήριο *Spirulina Platensis* έχει υψηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες, το περιεχόμενο των οποίων μετρήθηκε και τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.

8.3.1.2. Χλωροφύλλες α, β και γ



Διάγραμμα 2 Συγκέντρωση χλωροφυλλών α, β και γ των διαφόρων ειδών βιομάζας *Spirulina Platensis*

Γενικά, οι σημαντικότερες χλωροφύλλες στον τομέα των τροφίμων είναι η α και β χλωροφύλλη. Τα κυανοβακτήρια, μάλιστα, περιέχουν κυρίως χλωροφύλλη α. Όπως τα καροτενοειδή, έτσι και οι χλωροφύλλες είναι ευαίσθητες σε υποβάθμιση (degradation) κατά την ξήρανση. Το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες α και β μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου ξήρανσης. Αυτό συμβαίνει για τον παρακάτω λόγο. Ο πιο γνωστός μηχανισμός υποβάθμισης των χλωροφυλλών είναι η οξυ-καταλυόμενη μετατροπή τους σε φαιοφυτίνες. Οι φαιοφυτίνες είναι μόρια χλωροφυλλών, στα οποία λείπει ένα κεντρικό ιόν Mg^{2+} . Κατά την μετατροπή, παράγεται μια σκούρα μπλε χρωστική, με αποτέλεσμα να αλλάζει και το χρώμα του

μικροφύκους. Οι υψηλές θερμοκρασίες ξήρανσης, λοιπόν, οδηγούν σε αντικατάσταση του μαγνησίου της χλωροφύλλης με υδρογόνο, μετατρέποντας έτσι την χλωροφύλλη σε φαιοφυτίνη και οδηγώντας στην υποβάθμισή της (An-Erl King et al. 2001; Therdthai & Zhou 2009). Επίσης, σύμφωνα με τους Onayemi και Okeibuno Badifu, όσο συντομότερη είναι η διαδικασία ξήρανσης, τόσο βραδύτερος είναι ο ρυθμός αποδόμησης της χλωροφύλλης, (Onayemi & Badifu 1987).

Οι παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω γίνονται αντιληπτές και από το Διάγραμμα 2, όπου, όσον αφορά την χλωροφύλλη α, ακολουθείται περίπου η ίδια πτωτική τάση με τα καροτενοειδή. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί για την χλωροφύλλη α, είναι η πολύ μεγάλη απώλεια που συμβαίνει όταν συγκρίνεται η νωπή μορφή της Σπιρουλίνας με την ατμοσφαιρική, αλλά και οι πολύ μικρές διαφορές συγκέντρωσης που υπάρχουν μεταξύ της ατμοσφαιρικής, της ξήρανσης υπό κενό στους 30°C, της λυοφιλίωσης και της βιομηχανικής ξήρανσης. Αυτό πιθανόν εξηγείται από το ότι η οξειδωση που συμβαίνει κατά την παραμονή της Σπιρουλίνας στην ατμόσφαιρα επηρεάζει πολύ την συγκέντρωση της χλωροφύλλης α, καθότι βλέπουμε 70% απώλεια, αλλά η μέθοδος της ξήρανσης που εφαρμόζεται κάθε φορά δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο. Με άλλα λόγια, όπως φαίνεται, η οξειδωση είναι πιο καθοριστικός παράγοντας από την θερμοκρασία γιατί οι χλωροφύλλες δεν είναι τόσο θερμοευαίσθητες όσο τα καροτενοειδή.

Όπως προαναφέρθηκε για τα ολικά καροτενοειδή, στην λυοφιλίωση πιθανώς να υπάρχει αύξηση της οξειδωσης εξαιτίας της έκθεσης μεγαλύτερης επιφάνειας λόγω του μεγάλου πορώδους και της μεγάλης επιφάνειας των λυοφιλιωμένων προϊόντων (An-Erl King et al. 2001). Αυτό, καθώς και ο πολύ μεγάλος χρόνος ξήρανσης (8 ώρες) εξηγεί γιατί η λυοφιλίωση φαίνεται να είναι μια από τις χειρότερες μεθόδους για τις χλωροφύλλες β και γ και η τρίτη καλύτερη μέθοδος για την χλωροφύλλη α, εφόσον σημαντικό ποσό της χλωροφύλλης πρέπει να έχει μετατραπεί σε φαιοφυτίνη.

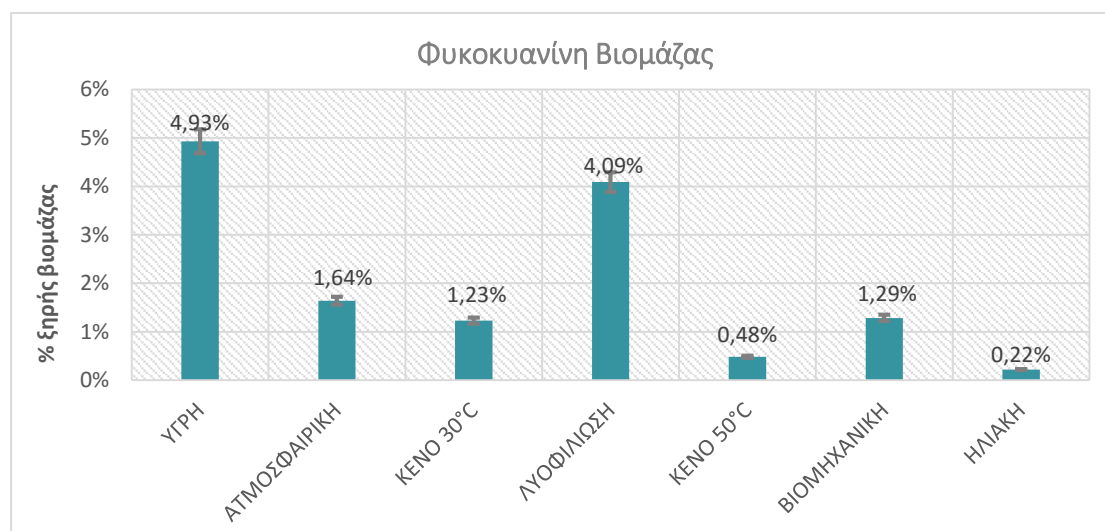
Μια ακόμα παρατήρηση που μπορεί να καταγραφεί είναι ότι ενώ η χλωροφύλλη α παρουσιάζει την ίδια εικόνα με τα ολικά καροτενοειδή του Διαγράμματος 1, εντοπίζεται μια διαφορά καθώς η βιομηχανική ξήρανση έχει καλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης α από την ξήρανση υπό κενό στους 50°C, σε αντίθεση με τα καροτενοειδή. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι το κενό, σε συνδυασμό με την αρκετά υψηλή θερμοκρασία των 50°C καταστρέφει την χλωροφύλλη α, παρά τον μικρότερο χρόνο ξήρανσης. Επιπρόσθετα, οι χλωροφύλλες, όπως και τα ολικά καροτενοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες. Επειδή λοιπόν, στην βιομηχανική ξήρανση, το δείγμα βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες (σε θερμοκήπιο), σε αντίθεση με την ξήρανση υπό κενό, ευνοείται η παραγωγή χλωροφύλλης σαν μηχανισμός αντίδρασης στην έκθεση του ήλιου.

Οι τάσεις υποβάθμισης της χλωροφύλλης α, β και γ δεν είναι ίδιες σύμφωνα με το Διάγραμμα 2. Όμως, παρόλο που η χλωροφύλλη α έχει ταχύτερη και μεγαλύτερη υποβάθμιση, και στις τρεις περιπτώσεις καλύτερη μέθοδος ξήρανσης θεωρείται η ατμοσφαιρική και χειρότερη η ηλιακή, όπου η προβολή φωτός είναι τόσο έντονη που

προκαλεί φωτοοξειδωση και καταστρέφει σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% και τις τρεις χλωροφύλλες. Αυτό είναι πολύ ενδιαφέρον, αν αναλογιστεί κανείς πως οι θερμοκρασίες στις οποίες φτάνουν τα δύο είδη ξήρανσης (ηλιακή και βιομηχανική) είναι σχεδόν ίδιες (πάνω από 60°C), ο χρόνος της ηλιακής ξήρανσης είναι πολύ μικρότερος (90') από την βιομηχανική (180') και όμως η απώλεια των χλωροφυλλών στην πρώτη ξήρανση είναι πολύ μεγαλύτερη από την δεύτερη. Γίνεται εμφανής, λοιπόν, η πολύ μεγάλη επιρροή της έντασης του φωτός κατά την ξήρανση στην συγκέντρωση των χρωστικών, που ξεπερνά την επίδραση της θερμοκρασίας.

8.3.1.3. Φυκοκυανίνη

Ακολουθώς, οι μετρήσεις της συγκέντρωσης φυκοκυανίνης στα διάφορα είδη πρώτων υλών Σπιρουλίνας εμφανίζονται στο Διάγραμμα 3, όπου η φυκοκυανίνη είναι εκφρασμένη σε ποσοστό επί τις εκατό ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 3. Συγκέντρωση Φυκοκυανίνης των διαφόρων ειδών Βιομάζας *Spirulina Platensis*

Όπως είναι φανερό, το σκηνικό σε αυτήν την χρωστική αλλάζει με την λυοφιλίωση να είναι η καλύτερη μέθοδος ξήρανσης που διατηρεί σε πολύ μεγάλο ποσοστό την σημαντικότερη χρωστική της Σπιρουλίνας, την φυκοκυανίνη. Εφόσον, τις περισσότερες, αν όχι όλες, τις φορές, αυτό που ενδιαφέρει εμπορικά στο μικροφύκος Σπιρουλίνα είναι η φυκοκυανίνη, η λυοφιλίωση μπορεί να θεωρηθεί ως ο ιδανικός τρόπος ξήρανσης.

Οι E.G. Oliveira και A. Morist αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι η λυοφιλίωση συνιστάται για την Σπιρουλίνα λόγω της σχεδόν μηδενικής υποβάθμισης της φυκοκυανίνης και της υψηλότερης ποιότητας της βιομάζας. Οι αλλαγές που επιφέρει στο θρεπτικό και φυσικοχημικό περιεχόμενο του κυανοβακτηρίου είναι ελάχιστες και τα λυοφιλιώμενα προϊόντα μοιάζουν πολύ με την νωπή βιομάζα (Oliveira et al. 2008; Morist et al. 2001). Μάλιστα, ο A. Morist βρίσκει ότι το ποσοστό της φυκοκυανίνης στην ξηρή βιομάζα που έχει υποστεί λυοφιλίωση είναι $4,00 \pm 1,00\%$, ποσοστό δηλαδή ίδιο με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην εργασία. Επίσης, το ποσοστό της φυκοκυανίνης σε ξηρή βιομάζα που έχει υποστεί ξήρανση με ψεκασμό είναι

1,40±0,50%(Morist et al. 2001). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε ξήρανση με ψεκασμό το παραπάνω ποσοστό παρατίθεται γιατί έχει την ίδια περίπου τιμή με αυτήν της ατμοσφαιρικής, βιομηχανικής και ξήρανσης υπό κενό στους 30°C. Η αποδόμηση της φυκοκυανίνης με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό επιβεβαιώνεται και από παλιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο.

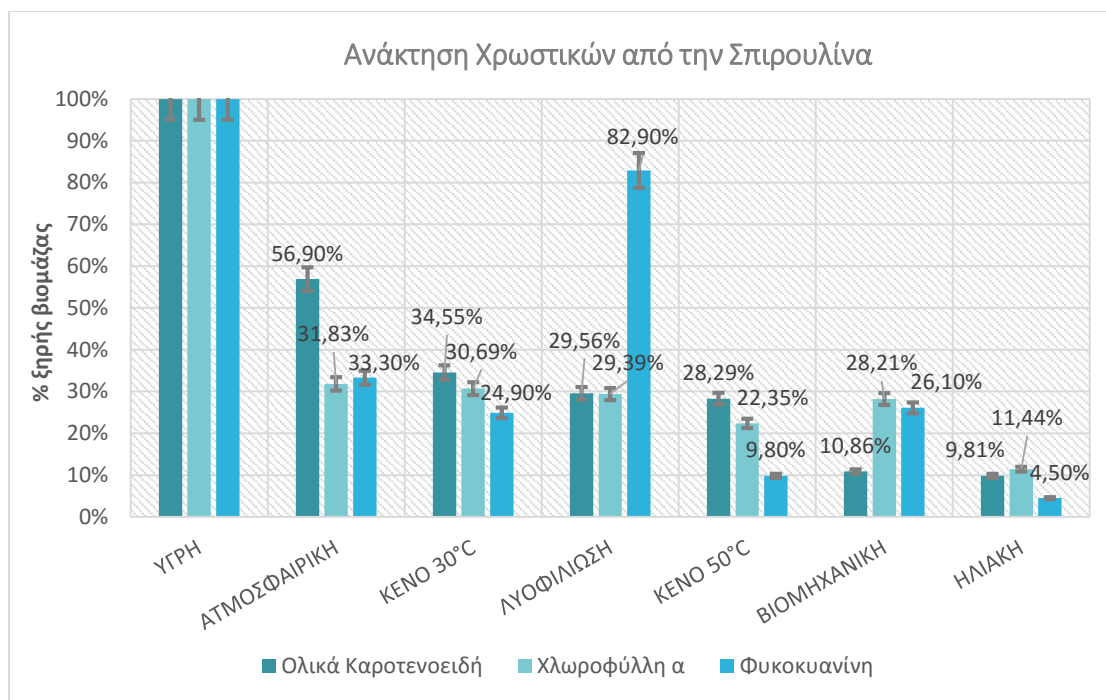
Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί πως το ποσοστό της φυκοκυανίνης στην ξηρή βιομάζα της Σπιρουλίνας έχει μεγάλο εύρος τιμών, με τον Z. Huang να παραθέτει την μέγιστη τιμή του περιεχομένου σε φυκοκυανίνη υπό συνθήκες στρες στο 14,8% του ξηρού βάρους(Huang et al. 2007). Το στέλεχος *Spirulina Platensis* που έχει χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο βρέθηκε να έχει ποσοστό που υπολογίζεται στο 4,93% του ξηρού βάρους. Αυτό εξηγείται από το ότι το περιεχόμενο σε φυκοκυανίνη εξαρτάται σε σπουδαίο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας και αυτή η παράμετρος είναι δύσκολη να προβλεφθεί (Morist et al. 2001).

Βλέποντας το ποσοστό φυκοκυανίνης στην ηλιακή ξήρανση, παρατηρείται ότι αποτελεί την μικρότερη τιμή συγκρινόμενη με όλες τις μεθόδους. Αυτό, τονίζει ο E.G. Oliveira, οφείλεται στην σχεδόν ολική υποβάθμιση της φυκοκυανίνης σε θερμοκρασίες άνω των 60°C (Oliveira et al. 2008).

Γενικά, όπως αναφέρει ο E.G. Oliveira, η περιεκτικότητα της βιομάζας σε φυκοκυανίνη είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας και του χρόνου ξήρανσης. Όσο μεγαλύτεροι είναι αυτοί οι δύο παράγοντες, τόσο πιο αυξημένο είναι και το ποσοστό απώλειας σε φυκοκυανίνη (Oliveira et al. 2010). Η σημαντική απώλεια της φυκοκυανίνης στα ξηρά δείγματα οφείλεται στην περιφερειακή θέση της στα φυκοβιλιώματα στην θυλακοειδή μεμβράνη και αποδίδεται στην ευαισθησία της στην θερμοκρασία (Sarada et al. 1999)

8.3.1.4. Ανάκτηση Βιοδραστικών Ενώσεων

Οι αναλύσεις που έγιναν παραπάνω αναδεικνύονται καλύτερα στο συγκεντρωτικό Διάγραμμα 4, όπου θεωρώντας την συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και της φυκοκυανίνης στην υγρή Σπιρουλίνα ως το 100% των ποσοτήτων που μπορεί να αποκτήσει η Σπιρουλίνα, υπολογίζεται το ποσοστό ανάκτησης των τριών αυτών χρωστικών για τις διάφορες μεθόδους ξήρανσης.



Διάγραμμα 4. Ανάκτηση των Βιοδραστικών Ενώσεων: Ολικά Καροτενοειδή, Χλωροφύλλη α και Φυκοκυανίνη για τα διάφορα είδη Βιομάζας *Spirulina Platensis*

Συμπερασματικά, η ξήρανση της Σπιρουλίνας αποτελεί λυδία λίθο, όχι μόνο στην μείωση της περιεχόμενης υγρασίας, η οποία είναι απαραίτητη για την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και την βελτίωση της ποιότητας, αλλά και στην αποτελεσματικότητα της ανάκτησης των βιοδραστικών ενώσεων.

Σκοπός του συγκεντρωτικού διαγράμματος ανάκτησης των διάφορων χρωστικών είναι η σύγκριση των μεθόδων ξήρανσης και η εύκολη εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου ανάλογα με την χρωστική που ενδιαφέρει να υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό κάθε φορά. Για παράδειγμα, αν η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών και της χλωροφύλλης α είναι αυτή που ενδιαφέρει, τότε βέλτιστη μέθοδος ξήρανσης είναι η ατμοσφαιρική. Αντίθετα, αν ενδιαφέρει η περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνη, τότε επιλέγεται η λυοφιλίωση. Η πιο καταστροφική μέθοδος και για τις τρεις χρωστικές είναι η ηλιακή ξήρανση, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των χρωστικών για τα είδη ξήρανσης που εφαρμόζονται. Συνολικά, όταν η Σπιρουλίνα ξηραίνεται, ανεξαρτήτως του είδους ξήρανσης, παρατηρείται πολύ μεγάλη απώλεια στις χρωστικές της. Για παράδειγμα, στην ατμοσφαιρική ξήρανση τα καροτενοειδή εξαφανίζονται σε ποσοστό 43,00%, η χλωροφύλλη α σε ποσοστό 68,00% και η φυκοκυανίνη σε ποσοστό 66,70% σε σχέση με την νωπή Σπιρουλίνα. Συγκρίνοντας τις χρωστικές μεταξύ τους, συμπεραίνεται πως την μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεθόδους την έχουν τα καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες είναι θερμοευαίσθητες, αλλά οι ξηράνσεις τους δίνουν εφάμιλλα αποτελέσματα, με μόνη εξαίρεση την ηλιακή ξήρανση.

Εφόσον, στόχος της εργασίας είναι η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την παρασκευή εκχυλισμάτων πλούσιων σε χρωστικές και θρεπτικά, θα ήταν λογικό να

επιλεχθεί για μελέτη ένας τρόπος ξήρανσης που επηρεάζει όσο το δυνατόν λιγότερο την συγκέντρωση των χρωστικών, όπως η ατμοσφαιρική ή η λυοφιλίωση. Παρόλο όμως που οι δύο μέθοδοι έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα είναι αρκετά χρονοβόρες και για αυτό είναι δύσκολο να εφαρμοστούν στις σύγχρονες βιομηχανικές συνθήκες. Έτσι, επιλέχθηκε, εκτός από την νωπή Σπιρουλίνα, να μελετηθεί και να εκχυλιστεί η Σπιρουλίνα, στην οποία εφαρμόστηκε η βιομηχανική ξήρανση, καθώς αυτή η μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλες τις μονάδες παραγωγής και επίσης εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα στην συγκέντρωση της χλωροφύλλης α και κυριότερα της φυκοκυανίνης.

8.3.2. Επίδραση της περιεχόμενης υγρασίας και του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο

Η εκχύλιση 2,5 gr ξηρού βάρους Σπιρουλίνας με 50 ml διαλύτη στις συνθήκες που αναφέρθηκαν στην ενότητα 8.2.2., έδωσε τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 12.

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε συχνότητα 25 kHz, στα 450 Watt και σε θερμοκρασία 30 °C και διαρκούσαν 5 min . Οι συνθήκες αυτές εφαρμόστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις και θεωρούνται βέλτιστες για τους παρακάτω λόγους.

Αρχικά, ο χρόνος εκχύλισης αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα, με την απόδοση της εκχύλισης να αυξάνεται εκθετικά μέχρι τα 4 min, ύστερα με πολύ μικρό ρυθμό μέχρι τα 8 min και έπειτα να παραμένει σταθερή, όσο χρόνο και να διαρκέσει η εκχύλιση. Με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, η μεταφορά μάζας αυξάνεται επειδή το κυτταρικό τοίχωμα της Σπιρουλίνας διασπάται, μέχρι κάποιου σημείου, όπου η περαιτέρω αύξηση του χρόνου δεν επιφέρει αλλαγές (Dey & Virendra K. Rathod 2013). Η διαφορά των αποδόσεων στα 5 και 8 min δεν είναι μεγάλη, η διαφορά στους χρόνους, όμως των 5 και των 8 min είναι σημαντική για την βιομηχανική πραγματικότητα όπου μικρότερος χρόνος σημαίνει μεγαλύτερη οικονομικότητα. Για αυτό αποφασίστηκε ο χρόνος εκχύλισης να είναι 5 min.

Όσον αφορά την θερμοκρασία της εκχύλισης, η επίδρασή της έχει επίσης μελετηθεί από τους ερευνητές Dey και Rathod, από τους 10°C μέχρι τους 50°C γιατί οι βιοδραστικές ενώσεις είναι θερμοευαίσθητες και πιο υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να τις καταστρέψουν. Στην εκχύλιση με υπερήχους, δύο φαινόμενα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, το φαινόμενο της σπηλαίωσης και η θερμική επίδραση. Το πρώτο φαινόμενο λειτουργεί με την κατάρρευση των φυσαλίδων σπηλαίωσης και το δεύτερο με την διόγκωση και την χαλάρωση της κυτταρικής δομής, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφοράς μάζας των ενδοκυτταρικών προϊόντων στον εκάστοτε διαλύτη. Σε χαμηλές θερμοκρασίες η θερμική επίδραση είναι αμελητέα και έτσι η απόδοση της εκχύλισης είναι χαμηλή. Καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 30°C, τα δύο φαινόμενα κυριαρχούν και ο συνδυασμός τους οδηγεί σε υψηλότερη απόδοση. Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 40°C έχει αρνητική επίδραση στο φαινόμενο της σπηλαίωσης, καθώς η ένταση της σπηλαίωσης μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Για αυτό και η απόδοση της εκχύλισης είναι μικρότερη. Η

περαιτέρω αύξηση στην θερμοκρασία δεν επιφέρει βελτίωση της απόδοσης (Dey & Virendra K. Rathod 2013). Στα πειράματα επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 30°C, ώστε η συνολική διεργασία να είναι οικονομική και η απόδοσή της υψηλή.

Τέλος, η αναλογία βιομάζας/διαλύτη είναι μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που βελτιστοποιούν την διαδικασία εκχύλισης. Γενικά, η αύξηση της αναλογίας από 0,01 g/ml έως 0,03 g/ml δείχνει μια σταδιακή αύξηση της απόδοσης, ενώ με περαιτέρω αύξηση της αναλογίας η απόδοση παραμένει σταθερή. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι σε πολύ μικρές αναλογίες, ο όγκος του διαλύτη είναι υψηλός και η ποσότητα της Σπιρουλίνας χαμηλή (Dey & Virendra K. Rathod 2013). Οι χαμηλές αναλογίες βιομάζας/διαλύτη οδηγούν σε χαμηλές αποδόσεις εκχύλισης, για αυτό και στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η αναλογία ξηρής βιομάζας Σπιρουλίνας/διαλυτών ήταν 0,05 g/ml.

Όσον αφορά τους διαλύτες, είναι γνωστό πως το νερό και η αιθανόλη είναι πολικοί, σε αντίθεση με την ακετόνη και το εξάνιο. Οι τέσσερις παραπάνω διαλύτες επιλέχθηκαν γιατί προτείνονται βιβλιογραφικά από πολλές έρευνες που ασχολούνται με την εκχύλιση της Σπιρουλίνας (Jaime et al. 2005; Silveira et al. 2007; Dey & Virendra K. Rathod 2013). Ο σημαντικότερος λόγος, όμως, επιλογής τους είναι η μελέτη της επιρροής της πολικότητας και της φύσης ενός διαλύτη στην ανάκτηση του βιοδραστικού περιεχομένου από την βιομάζα της πρώτης ύλης. Επιπλέον, το νερό και η αιθανόλη επιλέχθηκαν διότι είναι βρώσιμοι, άρα μπορούν να ενσωματωθούν στα τρόφιμα και να καταναλωθούν από τον άνθρωπο.

Πίνακας 12. Η ποσότητα εκχυλισμάτων και πέλετ και οι αποδόσεις αυτών για την νωπή και ξηρή *Spirulina Platensis*

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ			PELLET	
		ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ml)	ΞΗΡΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)	PELLET (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)
ΥΓΡΗ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑ	ΝΕΡΟ	64,00	0,82	33,28	0,17	7,04
	ΕΞΑΝΙΟ	29,60	0,003	0,12	1,11	45,20
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	56,20	1,16	47,16	1,39	56,32
	ΑΚΕΤΟΝΗ	55,00	0,66	26,26	1,99	79,24
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑ	ΝΕΡΟ	43,20	1,91	77,02	0,80	32,13
	ΕΞΑΝΙΟ	42,00	0,01	0,47	2,41	97,33
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	43,90	0,04	1,77	2,38	96,03
	ΑΚΕΤΟΝΗ	45,00	0,01	0,53	2,38	97,21

Όσον αφορά το ολικό εκχύλισμα (ml) φαίνεται ότι εκχυλίζοντας την υγρή Σπιρουλίνα, προκύπτει πολύ περισσότερη ποσότητα ολικού εκχυλίσματος, από ότι την βιομηχανική. Γνωρίζοντας ότι η υγρασία της νωπής Σπιρουλίνας είναι 88,84%, για να εκχυλιστούν 2,5 gr ξηρής βάσης, πρέπει να τοποθετηθούν 22 gr νωπής. Έτσι, η πολύ μεγάλη ποσότητα εσωτερικού νερού αυξάνει και την συνολική ποσότητα του ολικού εκχυλίσματος.

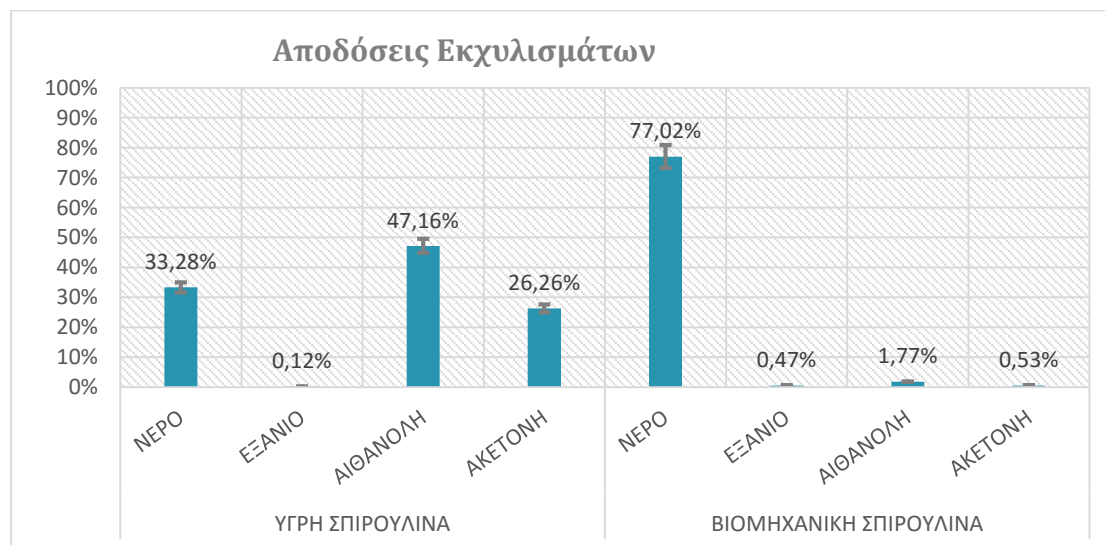
Παρόλα αυτά, το εξάνιο έχει ολικό εκχύλισμα μόνο 26,90 ml. Μετά την εκχύλιση και την φυγοκέντρηση της νωπής Σπιρουλίνας με τον διαλύτη του εξανίου υπάρχουν τρεις φάσεις, μία υγρή του εξανίου (υπερκείμενο), μια στερεή φάση εξανίου-Σπιρουλίνας και μια στερεή φάση νερού-Σπιρουλίνας. Αυτό είναι αναμενόμενο, αφού το νερό που περιέχει η νωπή Σπιρουλίνα (υγρασία) και το εξάνιο δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους και διαχωρίζονται σε στιβάδες. Οι δύο τελευταίες φάσεις φαίνονται στην Εικόνα 12. Για αυτό και το υπερκείμενο του εξανίου είναι το μισό περίπου σε ποσότητα από των άλλων διαλυτών.



Εικόνα 12: Οι δύο στιβάδες που προκύπτουν μετά την φυγοκέντρηση του διαλύματος *Spirulina Platensis* -εξανίου και την απομάκρυνση της πρώτης φάσης (υπερκείμενο).

Στην βιομηχανική Σπιρουλίνα, παρατηρείται ότι το ολικό εκχύλισμα είναι το ίδιο σχεδόν για όλους τους διαλύτες.

Οι αποδόσεις που υπολογίστηκαν για τα εκχυλίσματα και τα υπολείμματα των εκχυλίσεων στον Πίνακα 12 μπορούν να εκτιμηθούν και συγκριθούν καλύτερα στα Διαγράμματα 5 και 6, που παρουσιάζονται παρακάτω.



Διάγραμμα 5. Αποδόσεις των Εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από τα παραπάνω είναι ποικίλα. Αρχικά, συγκρίνοντας τους διαλύτες, αυτός που έχει πολύ καλά αποτελέσματα είναι

το νερό. Γενικά, με βάση πολλές μελέτες, είναι γνωστό ότι τα κύτταρα της βιομάζας της *Spirulina Platensis* είναι πιο διαλυτά σε πολικούς διαλύτες, όπως το νερό και η αιθανόλη, σε σχέση με λιγότερο πολικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη και το εξάνιο (Agustini et al. 2015). Αυτό εξηγεί και το γιατί το νερό και η αιθανόλη έχουν πολύ καλύτερες αποδόσεις. Επίσης, το νερό είναι ένα μικρό μόριο και μπορεί με μεγάλη ευκολία να εισχωρήσει στον ιστό της Σπιρουλίνας. Όπως φαίνεται, όμως, η απόδοση του νερού στην ξηρή βιομάζα είναι δυόμιση φορές μεγαλύτερη από την απόδοση του στην υγρή βιομάζα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κύτταρα της υγρής βιομάζας περιέχουν ήδη μεγάλο ποσοστό εσωτερικού νερού. Έτσι, το εσωτερικό νερό λειτουργεί ανταγωνιστικά με το νερό ως διαλύτης, το οποίο αραιώνεται πολύ. Με άλλα λόγια, η εκχύλιση στερεού-υγρού βασίζεται σε φαινόμενα διάχυσης και για τον λόγο αυτό η υδατική εκχύλιση της ξηρής βιομάζας ευνοείται λόγω του καλύτερου εμποτισμού και διάχυσης του διαλύτη στο εσωτερικό της.

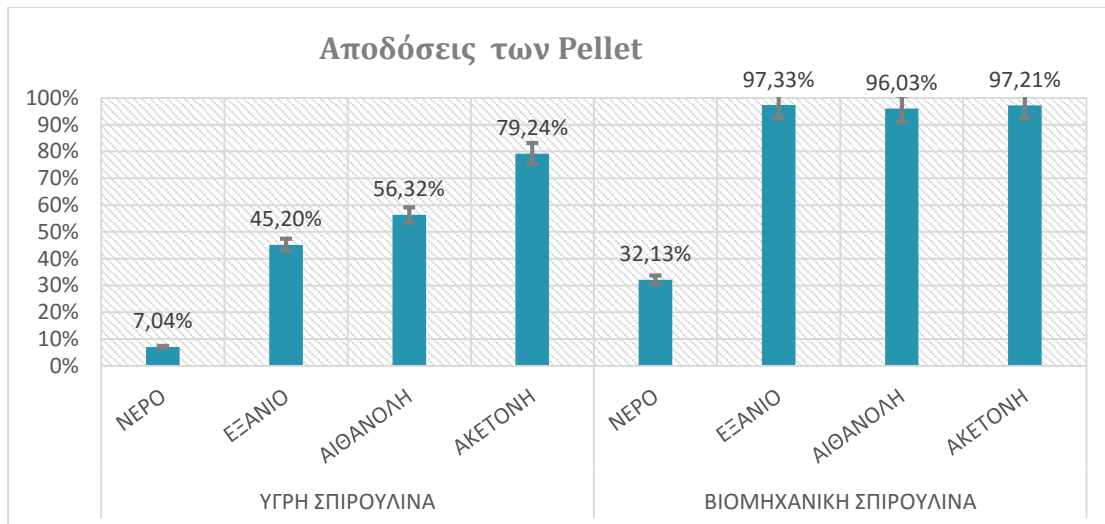
Επιπλέον προξενεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενώ η αιθανόλη έχει την καλύτερη απόδοση στην νωπή Σπιρουλίνα, η απόδοση του βιομηχανικού εκχυλίσματός της είναι κατά 27 σχεδόν φορές χειρότερη. Γενικά, η νωπή Σπιρουλίνα έχει 11 φορές περισσότερη υγρασία από την βιομηχανική. Το εσωτερικό νερό της νωπής βιομάζας, λοιπόν, δρα σαν συνδιαλύτης με την αιθανόλη και οδηγεί στην αύξηση της απόδοσης. Δηλαδή, επειδή ο διαλύτης της αιθανόλης αποτελείται από μεγάλα μόρια (C_2H_6O) που δεν μπορούν να εισχωρήσουν εύκολα στον φυτικό ιστό της Σπιρουλίνας, όταν βρίσκονται με το νερό, αραιώνονται και εισχωρούν πιο εύκολα, κάτι που δεν συμβαίνει με την βιομηχανική ξηρή Σπιρουλίνα.

Η ίδια ακριβώς εξήγηση μπορεί να δοθεί και για την ακετόνη, η συμπεριφορά της οποίας είναι παρόμοια με της αιθανόλης. Η παρεμπόδιση της ακετόνης ενισχύεται στην περίπτωση της βιομηχανικής Σπιρουλίνας, αφού το μόριό της είναι μεγαλύτερο (C_3H_6O).

Τέλος, το εξάνιο έχει με μεγάλη διαφορά τα χειρότερα αποτελέσματα, με τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων του να φτάνουν κοντά στο μηδέν. Αυτό οφείλεται στο πολύ μεγάλο μέγεθος των μορίων του (C_6H_{14}), στην μη πολικότητά του, αλλά και στην μη αναμιξιμότητά του με το εσωτερικό νερό στην νωπή Σπιρουλίνα.

Η σπουδαιότερη παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι όσο μικρότερο και πολικότερο είναι το μόριο του διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση, όπως το μόριο του νερού, τόσο υψηλότερη είναι η απόδοση. Το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει με τους διαλύτες που έχουν μεγάλα μόρια, όπως το εξάνιο, για τους οποίους ο χρόνος εκχύλισης των πέντε λεπτών που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο είναι πιθανόν μικρός. Σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, ίσως οι οργανικοί διαλύτες να είχαν καλύτερη απόδοση, αφού οι συνθήκες των πέντε λεπτών δεν αρκούν.

Η αντίστοιχη απόδοση των πέλετ (pellet) εμφανίζεται στο Διάγραμμα 6.



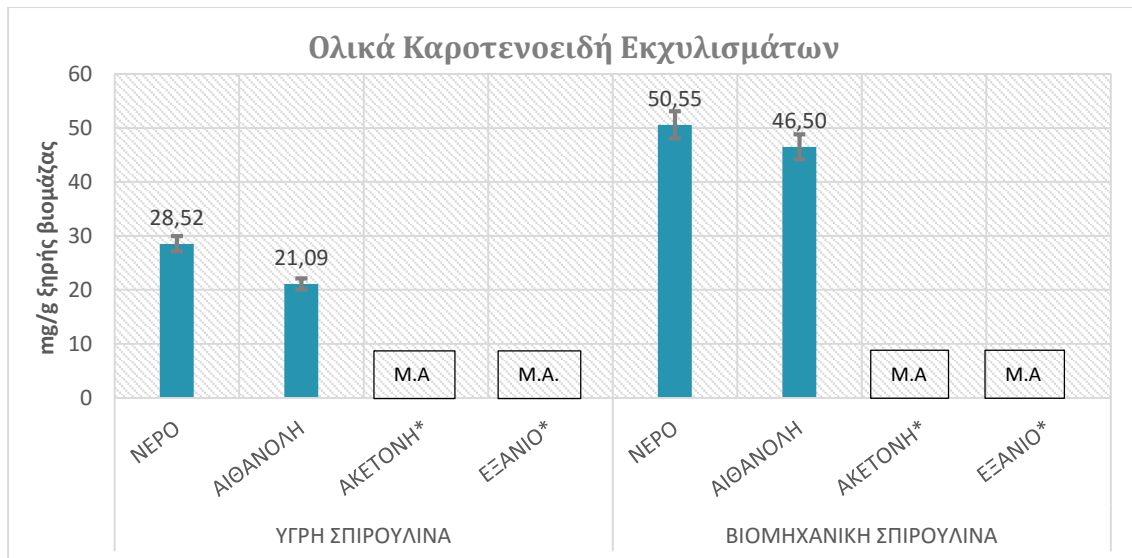
Διάγραμμα 6. Αποδόσεις των Pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Συγκριτικά με το Διάγραμμα 5, παρατηρείται ότι όταν οι αποδόσεις των εκχυλισμάτων είναι μικρές (βιομηχανική Σπιρουλίνα: εξάνιο, αιθανόλη, ακετόνη), οι αντίστοιχες αποδόσεις των πέλετ είναι πολύ μεγάλες και το αντίθετο (βιομηχανική Σπιρουλίνα: νερό). Δηλαδή, οι αποδόσεις εκχυλίσματος και πέλετ είναι συμπληρωματικές μέχρι το 100% της απόδοσης. Μοναδικές εξαιρέσεις στο παραπάνω σχόλιο αποτελούν η εκχύλιση της νωπής Σπιρουλίνας με νερό και εξάνιο. Η πρώτη εξαίρεση του νερού συμβαίνει λόγω των μεγάλων απωλειών που υπήρχαν καθώς η νωπή Σπιρουλίνα είναι ένα υλικό που διαχειρίζεται δύσκολα. Η υγρή Σπιρουλίνα βρισκόταν σε λασπώδη μορφή, με αποτέλεσμα το πέλετ να μην μπορεί να περισυλλεχθεί εύκολα από το γυάλινο σκεύος της εκχύλισης (beaker) και να χάνονται σημαντικές ποσότητες βιομάζας που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόδοση. Η δεύτερη εξαίρεση του εξανίου οφείλεται, όπως εξηγήθηκε παραπάνω, στην μη ανάμειξη νερού και εξανίου και στην δημιουργία τριών στιβάδων. Έτσι, εφόσον μόνο η μια στερεή φάση περισυλλέγεται για μέτρηση από τα δοχεία της φυγόκεντρου, γίνεται κατανοητό πως υπάρχει μεγάλη απώλεια.

Επιπρόσθετη παρατήρηση είναι ότι, εκτός από το νερό και για την νωπή και για την βιομηχανική Σπιρουλίνα, η απόδοση των πέλετ είναι καλύτερη από την απόδοση των εκχυλισμάτων σε όλες τις περιπτώσεις. Ίσως, αυτό να οφείλεται στον χρόνο, την θερμοκρασία εκχύλισης και την αναλογία στερεού/διαλύτη που επηρεάζουν πολύ τις αποδόσεις. Όπως τονίστηκε παραπάνω, όμως, οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν θεωρούνται βέλτιστες και οικονομικές.

8.3.2.1. Ολικά Καροτενοειδή

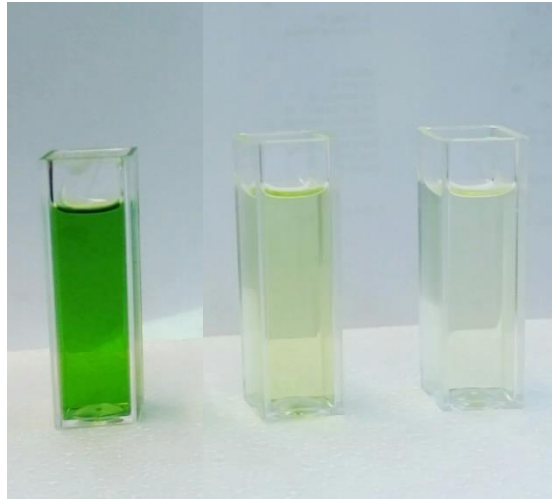
Οι μετρήσεις της συγκέντρωσης των ολικών καροτενοειδών των εκχυλισμάτων, εκφρασμένη σε mg καροτενοειδών/g ξηρής βιομάζας που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με βάση το πρωτόκολλο του Jeffrey (Jeffrey et al. 1997), παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7.



Διάγραμμα 7. Συγκεντρώσεις Ολικών Καροτενοειδών στα Εκχυλίσματα της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis* (*M.A. : Μη ανιχνεύσιμο)

Το περιεχόμενο των ολικών καροτενοειδών στα εκχυλίσματα της ακετόνης και του εξανίου δεν ήταν δυνατό να βρεθεί. Αυτό οφείλεται στην πολύ μικρή απόδοση που είχαν αυτοί οι δύο διαλύτες, όπως συζητήθηκε στο Διάγραμμα 5. Δηλαδή, τα εκχυλίσματα κατά την ξήρανσή τους ήταν πολύ υγρά και ακόμα μετά από ημέρες παραμονής τους στον απαγωγό δεν ήταν δυνατό να εξατμιστούν και να ληφθούν απολύτως ξηρά δείγματα, τα οποία θα χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών σύμφωνα με το πρωτόκολλο Jeffrey 1997. Παρόλο που έγιναν προσπάθειες φασματοφωτομέτρησης του σχετικώς ξηρού δείγματος (με την υγρασία που είχε απομείνει), η απορρόφηση στα μήκη κύματος που εξετάστηκαν ήταν μηδενική. Αυτή η μηδενική απορρόφηση μπορούσε να προβλεφθεί και από το χρώμα των δειγμάτων, το οποίο ήταν διαφανές (όπως η ακετόνη), κάτι που σημαίνει ότι δεν υπήρχαν χρωστικές (εικόνα 13). Αν και τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλα συνήθως, λόγω της παρουσίας μακρών ακόρεστων αλειφατικών αλυσίδων, όπως συμβαίνει και στα λιπαρά οξέα, και προβλεπόταν να διαλυθούν στο εξάνιο και την ακετόνη, που είναι λιπόφιλοι διαλύτες, αυτό δεν συνέβη λόγω της πολύ μικρής απόδοσης των εκχυλισμάτων.

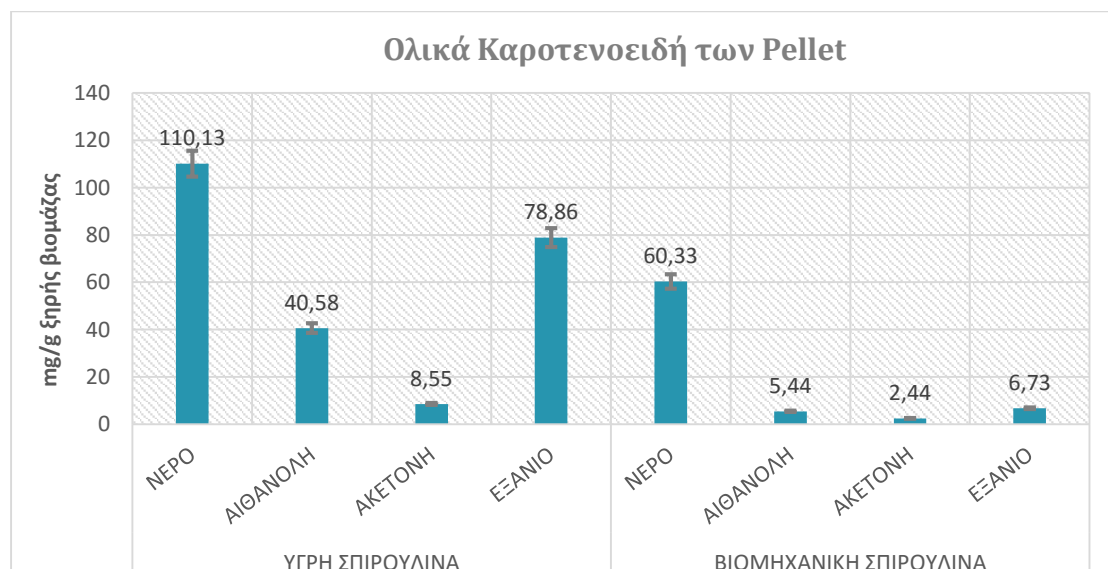
Το εξάνιο και η ακετόνη, λοιπόν, έχουν πάρα πολύ χαμηλότερη απόδοση καροτενοειδών από το νερό και την αιθανόλη. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και ο S. Dey, ο οποίος χρησιμοποίησε εξάνιο, η-επτάνιο και διαιθυλαιθέρα ως διαλύτες σε εκχύλιση με υπερήχους. Όπως εξηγείται, οι πολικοί διαλύτες (νερό και αιθανόλη) βοηθούν στην αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος των μικροφυκών, επομένως στην αύξηση της απόδοσης, και άρα της ανάκτησης των χρωστικών που περιέχονται στην πρώτη ύλη (Dey & Virendra K Rathod 2013).



Εικόνα 13. Η διαφορά χρώματος μεταξύ του εκχυλίσματος νερού με ακετόνη 90% και των αντίστοιχων εκχυλισμάτων με ακετόνη και εξάνιο

Συγκριτικά μεταξύ τους, αν και το νερό και η αιθανόλη είναι πολικοί πρωτικοί διαλύτες, είναι γνωστό πως το πρώτο είναι πιο πολικό από την δεύτερη. Για αυτό και έχει ανάκτησει περισσότερα καροτενοειδή. Αν θεωρηθεί, λοιπόν, ότι η πολικότητα είναι αυτή που επηρεάζει την συγκέντρωση των καροτενοειδών, η μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μπορεί να συγκριθεί και με την έρευνα του M.D. Sanchez. Εκεί, συγκρίνονται η μεθανόλη (παρόμοια πολικότητα με την αιθανόλη) και το διμεθυλφορμαμίδιο (DMF) με πολύ μεγαλύτερη πολικότητα. Τα αποτελέσματά του δείχνουν πολύ καλύτερη συγκέντρωση καροτενοειδών στο δεύτερο και εξηγείται ότι αυτό συμβαίνει λόγω υψηλότερης πολικότητας (Macías-Sánchez et al. 2009).

Τα ολικά καροτενοειδή των πέλετ που ανακτήθηκαν εμφανίζονται στο Διάγραμμα 8.



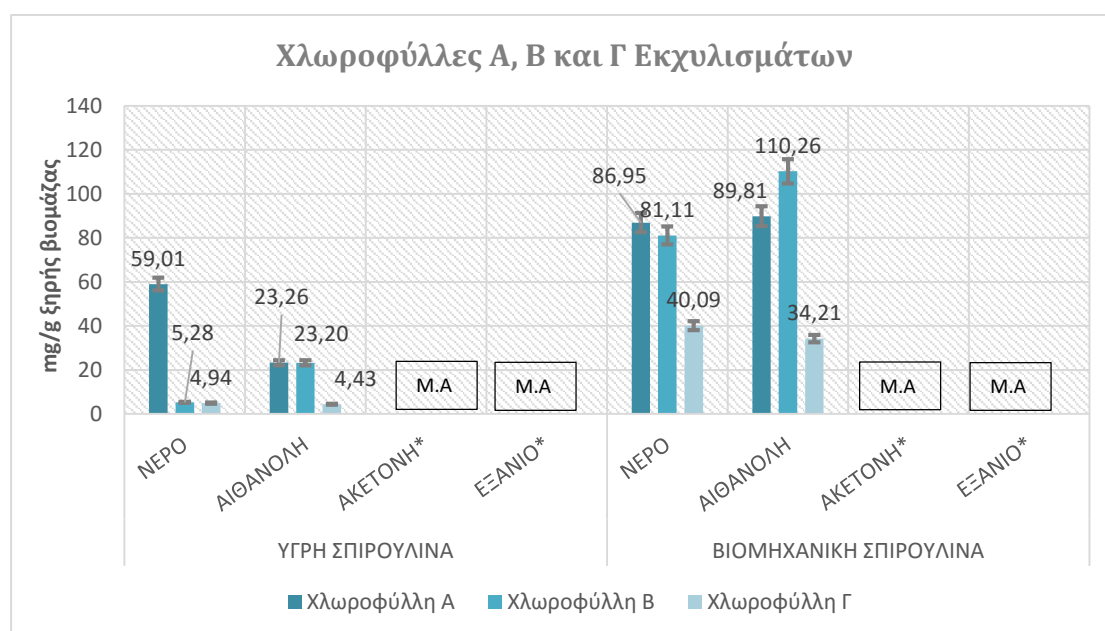
Διάγραμμα 8. Συγκεντρώσεις Ολικών Καροτενοειδών στα Pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Σε σύγκριση με το Διάγραμμα 7, φαίνεται ότι τα περισσότερα καροτενοειδή έχουν παραμείνει στα πέλετ. Το ίδιο παρατηρείται και για τις χλωροφύλλες και το β-

καροτένιο που θα αναλυθούν στην συνέχεια. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απόδοση της εκχύλισης είναι ο παράγοντας που επηρεάζει την ανάκτηση των χρωστικών, και αφού στο Διάγραμμα 6 φάνηκε ότι τα πέλετ έχουν καλύτερη απόδοση από τα εκχυλίσματα, είναι λογικό να έχουν και περισσότερες χρωστικές. Παρόλα αυτά, στην βιομηχανική Σπιρουλίνα, το νερό έχει την μισή συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών από την νωπή και η αιθανόλη, η ακετόνη και το εξάνιο έχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις, κάτι που οφείλεται και στην απόδοση της εκχύλισης, αλλά και στην υποβάθμιση της ίδιας της βιομάζας στην βιομηχανική ξήρανση.

8.3.2.2. Χλωροφύλλες

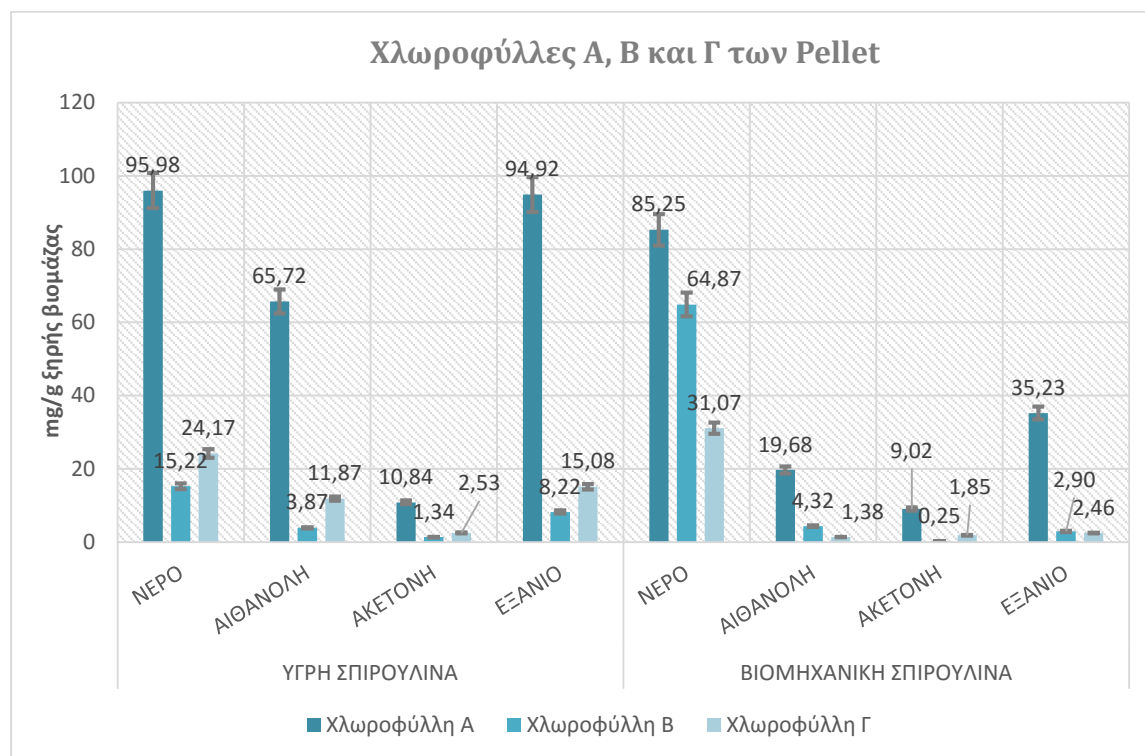
Το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων της Σπιρουλίνας σε χλωροφύλλες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9. Συγκεντρώσεις χλωροφυλλών α,β και γ των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis* (*M.A. : Μη Ανιχνεύσιμα)

Όπως και στα καροτενοειδή, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση η απορρόφηση των εκχυλισμάτων της ακετόνης και του εξανίου δεν ήταν δυνατό να προσδιορισθούν. Είναι προφανές ότι η χλωροφύλλη α ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτήν των καροτενοειδών στα εκχυλίσματα. Επίσης, οι χλωροφύλλες μεταξύ τους δεν έχουν τις ίδιες τάσεις. Το ίδιο ακριβώς συνέβαινε και στην σύγκρισή τους ανάλογα με την μέθοδο ξήρανσης που εφαρμοζόταν (Διάγραμμα 4). Αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι ότι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης β στο εκχύλισμα της αιθανόλης είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο εκχύλισμα του νερού. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα πειράματα των Oquist και Samuelsson, όπου η αιθανόλη ήταν ο διαλύτης που ανακτούσε τα μεγαλύτερα ποσοστά χλωροφύλλης β (Samuelsson & Oquist 1977)

Στο επόμενο Διάγραμμα 10 παρατίθενται οι τιμές των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών Α, Β και Γ σε mg ανά gr ξηρής βιομάζας για τα πέλετ.

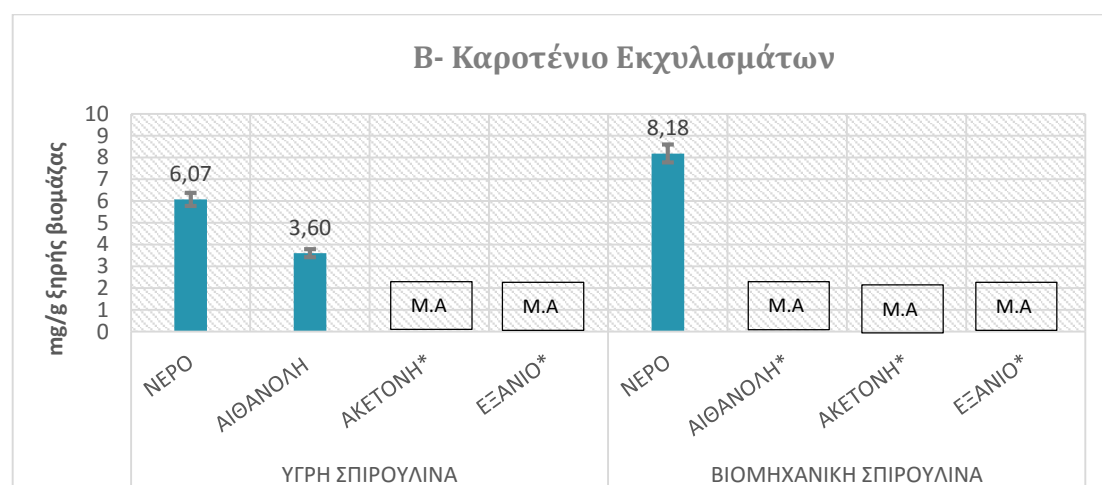


Διάγραμμα 10. Συγκεντρώσεις χλωροφυλλών α, β και γ των pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Είναι προφανές ότι όπως στα εκχυλίσματα, έτσι και στα πέλετ η πορεία των χλωροφυλλών είναι ίδια με την πορεία των καροτενοειδών.

8.3.2.3. Β-καροτένιο

Η συγκέντρωση του β-καροτενίου στα εκχυλίσματα και στα πέλετ εμφανίζεται στα Διαγράμματα 11 και 12.



Διάγραμμα 11. Συγκεντρώσεις β-καροτενίου των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis* (*M.A. : Μη Ανιχνεύσιμα)

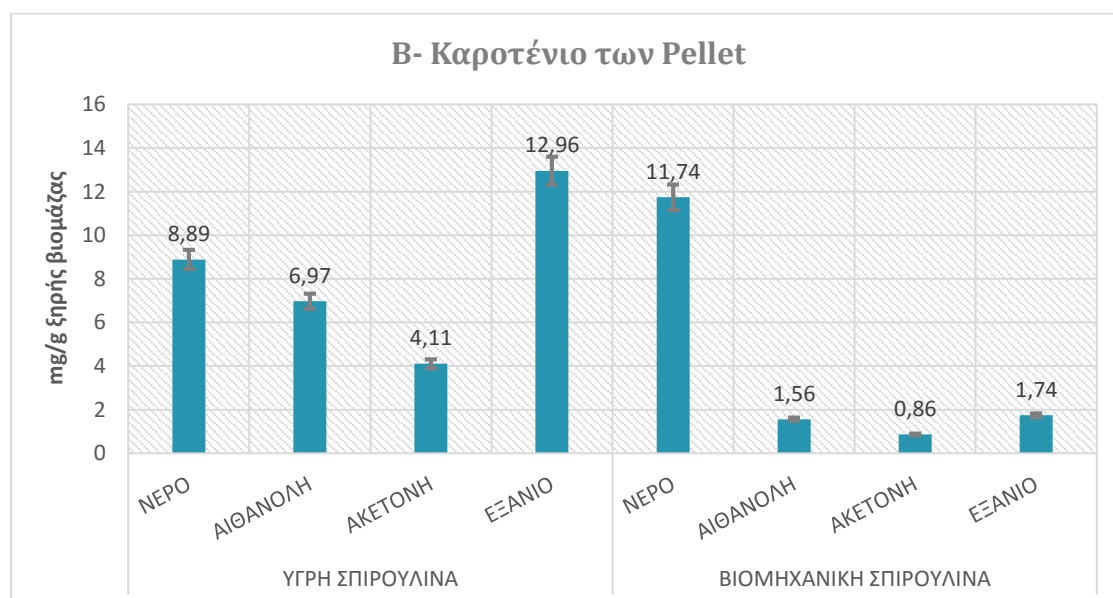
Τα εκχυλίσματα αιθανόλης (βιομηχανική), ακετόνης και εξανίου δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν. Πάντως, τα τρία δείγματα που προσδιορίστηκαν έχουν την ίδια τάση όπως τα ολικά καροτενοειδή.

Έχει ενδιαφέρον να υπολογιστεί η αναλογία του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή για τα εκχυλίσματα που μετρήθηκαν (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Ποσοστό β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή (%) στα εκχυλίσματα της *Spirulina Platensis* που ήταν δυνατό να προσδιορισθούν

Είδος Βιομάζας	Διαλύτης	Ποσοστό β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή(%)
Υγρή	Νερό	21,29±1,06%
	Αιθανόλη	17,08±0,86%
Βιομηχανική	Νερό	16,18±0,81%

Όλα τα παραπάνω ποσοστά φαίνονται πολύ μικρότερα σε σχέση με το μέγιστο ποσοστό του 67-79% του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή που παραθέτει ο S. Dey για την *Spirulina Platensis* (Dey & Virendra K. Rathod 2013). Όπως εξηγείται, επειδή το β-καροτένιο είναι μια μη πολική ένωση, οι μη πολικοί διαλύτες μπορούν να εκχυλίσουν τελείως το β-καροτένιο, ενώ οι πολικοί εκχυλίζουν ολοκληρωτικά τα πιο πολικά καροτενοειδή (Samuelsson & Oquist 1977). Επειδή το νερό και η αιθανόλη είναι πολικοί διαλύτες έχουν ανακτήσει τα πιο πολικά καροτενοειδή, με αποτέλεσμα το β-καροτένιο να αντιπροσωπεύει χονδρικά το 20,00% του συνόλου των παρόντων καροτενοειδών.

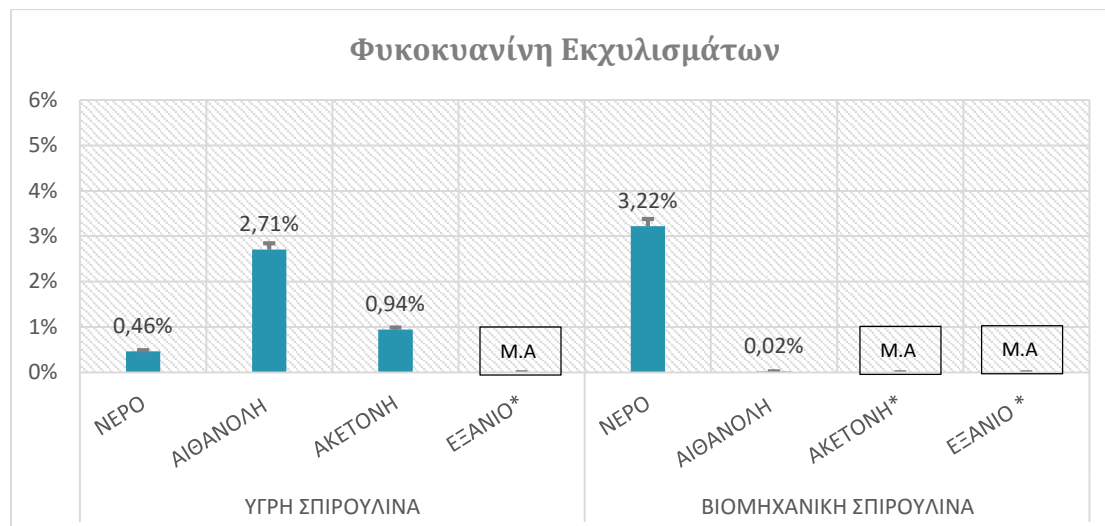


Διάγραμμα 12. Συγκεντρώσεις β-καροτενίου των pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Συμπερασματικά, η συγκέντρωση του β-καροτενίου στα εκχυλίσματα και τα υπολείμματα έχει ακριβώς την ίδια τάση με αυτήν των ολικών καροτενοειδών.

8.3.2.4. Φυκοκυανίνη

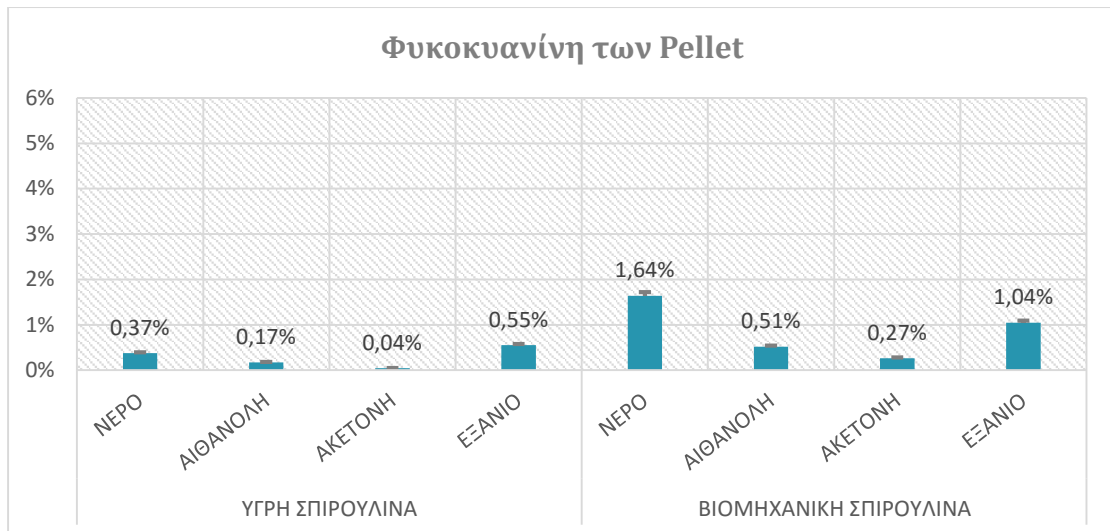
Το περιεχόμενο σε φυκοκυανίνη που μετρήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Boussiba & Richmond 1980, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13 για τα εκχυλίσματα του κυανοβακτηρίου *Spirulina Platensis*, ως ποσοστό επί τις εκατό στην ξηρή βιομάζα.



Διάγραμμα 13. Συγκεντρώσεις φυκοκυανίνης των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis* (*M.A. : Μη Ανιχνεύσιμα).

Όπως σε όλες τις βιοδραστικές ουσίες, έτσι και στην φυκοκυανίνη, η βιομηχανική Σπιρουλίνα που εκχυλίστηκε με νερό έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται και από το πείραμα του S.T. Silveira, όπου το νερό επιλέχθηκε ως ο καλύτερος διαλύτης γιατί μπορεί να διασπάσει περισσότερο το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της Σπιρουλίνας και να αυξήσει την απελευθέρωση της φυκοκυανίνης (Silveira et al. 2007). Η πολύ μεγάλη συγκέντρωση της νωπής Σπιρουλίνας που εκχυλίστηκε με αιθανόλη συγκριτικά με αυτή του νερού, οφείλεται στο ότι η πρώτη ευνοείται περισσότερο από την ύπαρξη εσωτερικού νερού στην νωπή βιομάζα, για αυτό εξάλλου και η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης στην βιομηχανική έχει μειωθεί κατακόρυφα, με σχεδόν μηδενική τιμή.

Τα ποσοστά της φυκοκυανίνης στην ξηρή βιομάζα των υπολειμμάτων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 14.

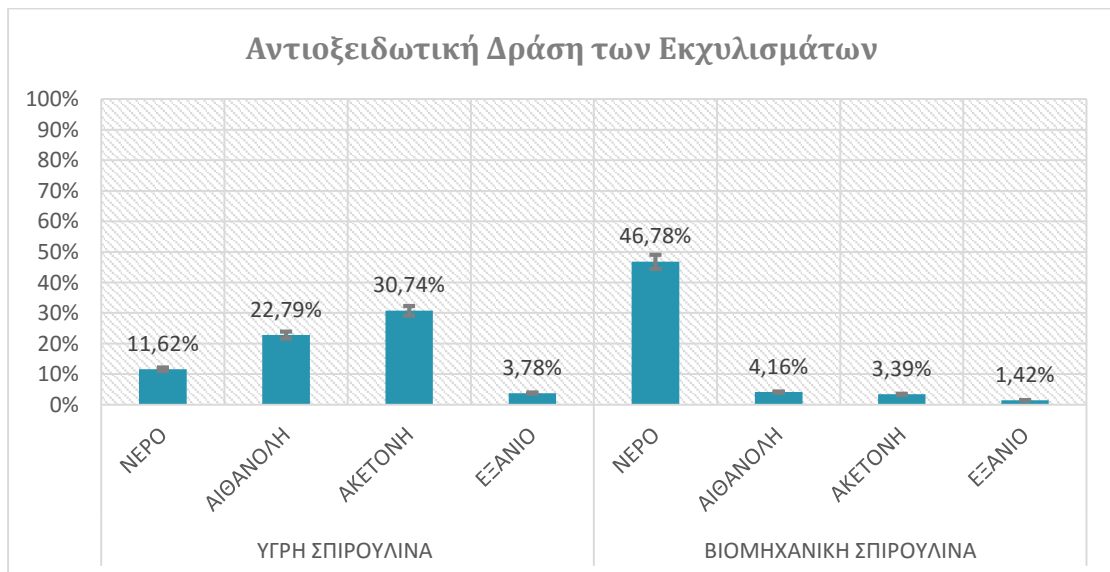


Διάγραμμα 14. Συγκεντρώσεις φυκοκυανίνης των pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

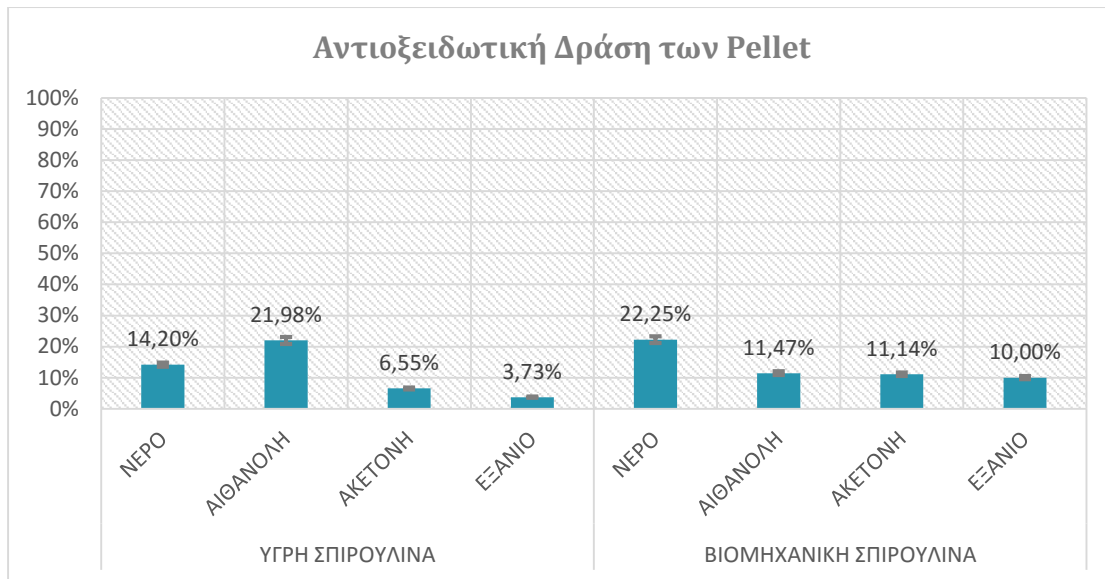
Όπως φαίνεται, η φυκοκυανίνη που έχει παραμείνει στα υπολείμματα των εκχυλίσεων έχει μικρότερη συγκέντρωση από των εκχυλισμάτων που μπόρεσαν να προσδιοριστούν. Έχει τονιστεί ότι η φυκοκυανίνη είναι η σημαντικότερη βιοδραστική ουσία της Σπιρουλίνας και το γεγονός ότι μερικά εκχυλίσματα ανάκτησαν την μεγαλύτερη ποσότητά της είναι πολύ ενθαρρυντικό και δείχνει πως η εκχύλιση των 5 min που πραγματοποιήθηκε ήταν όντως η βέλτιστη και η πιο οικονομική.

8.3.2.5. Αντιοξειδωτική Δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και των πέλετ για τους διάφορους διαλύτες και για τις δύο μορφές της βιομάζας (νωπή και βιομηχανική) παρουσιάζει στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 15. Αντιοξειδωτική Δράση των εκχυλισμάτων της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*



Διάγραμμα 16. Αντιοξειδωτική Δράση των pellet της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Από τα διαγράμματα 15 και 16 λαμβάνονται πολλές παρατηρήσεις.

Αρχικά, η αντιοξειδωτική δράση όλων των διαλυτών σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται να είναι περιορισμένη, με δύο εξαιρέσεις του νερού στο εκχύλισμα της βιομηχανικής Σπιρουλίνας και της ακετόνης στο εκχύλισμα της υγρής Σπιρουλίνας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το ότι τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν είναι σχετικά αραιά γιατί η αναλογία στερεού/υγρού είναι 1/20.

Γενικά, η αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα της *Spirulina Platensis* συνδέεται με τα καρτενοειδή, τα φαινολικά οξέα, τις χλωροφύλλες και τα προϊόντα υποβάθμισής τους και τις φυκοκυανίνες (Jaime et al. 2005).

Επίσης, όπως αναφέρει ο L. Muller, χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με την δραστική ρίζα DPPH δεν είναι δυνατή η ανίχνευση κάποιας σημαντικής δράσης των καρτενοειδών (Müller et al. 2011).

Ο συνδυασμός των παραπάνω αναφορών εξηγεί την γενική μειωμένη αντιοξειδωτική δράση της Σπιρουλίνας με την μέθοδο DPPH.

Μάλιστα, τα pellet έχουν χαμηλότερη απόδοση στα αντιοξειδωτικά από τα εκχυλίσματα. Πιθανώς αυτό το γεγονός να οφείλεται στην απόδοση της εκχύλισης και της ικανοποιητικής απομάκρυνσης του εκχυλίσματος κλάσματος της βιομάζας, το οποίο εμπεριέχει τα βιοδραστικά συστατικά με υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Άλλη σημαντική παρατήρηση είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση του εξανίου και της ακετόνης σε όλες τις περιπτώσεις, πλην της περίπτωσης της ακετόνης στο εκχύλισμα της υγρής σπιρουλίνας, είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τους δύο άλλους διαλύτες του νερού και της αιθανόλης.

Γενικά, η πολικότητα του διαλύτη καθορίζει τις φυτοχημικές ουσίες που θα εκχυλιστούν και χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη κάθε φορά είναι δυνατόν να εκχυλιστούν οι φυτοχημικές ενώσεις που ενδιαφέρουν (Agustini et al. 2015). Αυτό

επιβεβαιώθηκε και στις αποδόσεις της εκχύλισης, αλλά και στην ανάκτηση των χρωστικών, οι οποίες μεγάλωναν, αυξανομένης της πολικότητας του διαλύτη. Όπως έχει προαναφερθεί στην εργασία, η διαφορά στις πολικότητες των διαλυτών είναι σημαντική (διηλεκτρική σταθερά ίση με 1,88 για το εξάνιο, 24,55 για την αιθανόλη, 21 για την ακετόνη και 80 για το νερό). Με βάση πολλές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και της περιεκτικότητας σε φυτοχημικές ενώσεις (Agustini et al. 2015). Έτσι, λοιπόν, επειδή καλύτερα αποτελέσματα στην συγκέντρωση των χρωστικών στα εκχυλίσματα έδειξαν το νερό και η αιθανόλη, είναι επόμενο να έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Επίσης, τα φαινολικά είναι γνωστά ως υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ενώ τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Έτσι, είναι λογικό τα φαινολικά να διαλύονται στο νερό και σε άλλους υδρόφιλους διαλύτες, ενώ τα καροτενοειδή να διαλύονται σε λιπόφιλες ουσίες. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οι δύο διαλύτες του εξανίου και της ακετόνης που εξετάζονται έχουν προσροφήσει περισσότερα καροτενοειδή από ότι φαινολικά.

Όμως, όπως προαναφέρθηκε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με την ρίζα DPPH δεν μπορεί να ανιχνεύσει αποτελεσματικά την δράση των καροτενοειδών. Αντίθετα, με την μέθοδο FRAP, τα καροτενοειδή και ιδιαίτερα το λυκοπένιο και τα υδροξυ-καροτενοειδή (hydroxy carotenoids), είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην μείωση των ιόντων σιδήρου λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης και της χαμηλής χημικής δραστηριότητας των κυκλικών καροτενίων και των καρβονυλ-υποκατεστημένων παραγώγων τους (Müller et al. 2011).

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η ακετόνη και το εξάνιο είναι ιδιαίτερα πτητικές ενώσεις, οπότε στις σχετικά υψηλές θερμοκρασίες στο εσωτερικό του φασματοφωτόμετρου κατά την διάρκεια της μιας ώρας εξατμίζονταν σε κάποιο ποσοστό, με αποτέλεσμα να χάνεται ποσότητα αντιοξειδωτικού και να μην πραγματοποιείται η αντίδραση όπως θα έπρεπε. Το γεγονός αυτό έγινε προσπάθεια να περιοριστεί σε κάποιο βαθμό με την χρήση πάραφιλμ στις κυβέττες.

Όλα τα παραπάνω εξηγούν γιατί οι διαλύτες εξάνιο και ακετόνη παρουσιάζουν αποθαρρυντικά αποτελέσματα. Το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει με το νερό και την αιθανόλη που «τραβάνε» ενώσεις που δίνουν υδρογόνο και έχουν πιο γρήγορη αντιοξειδωτική δράση. Είναι πολύ πιθανό το σκηνικό να αλλάζει με την εφαρμογή της μεθόδου FRAP, η οποία χρησιμοποιείται συχνά για να μετρήσει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών.

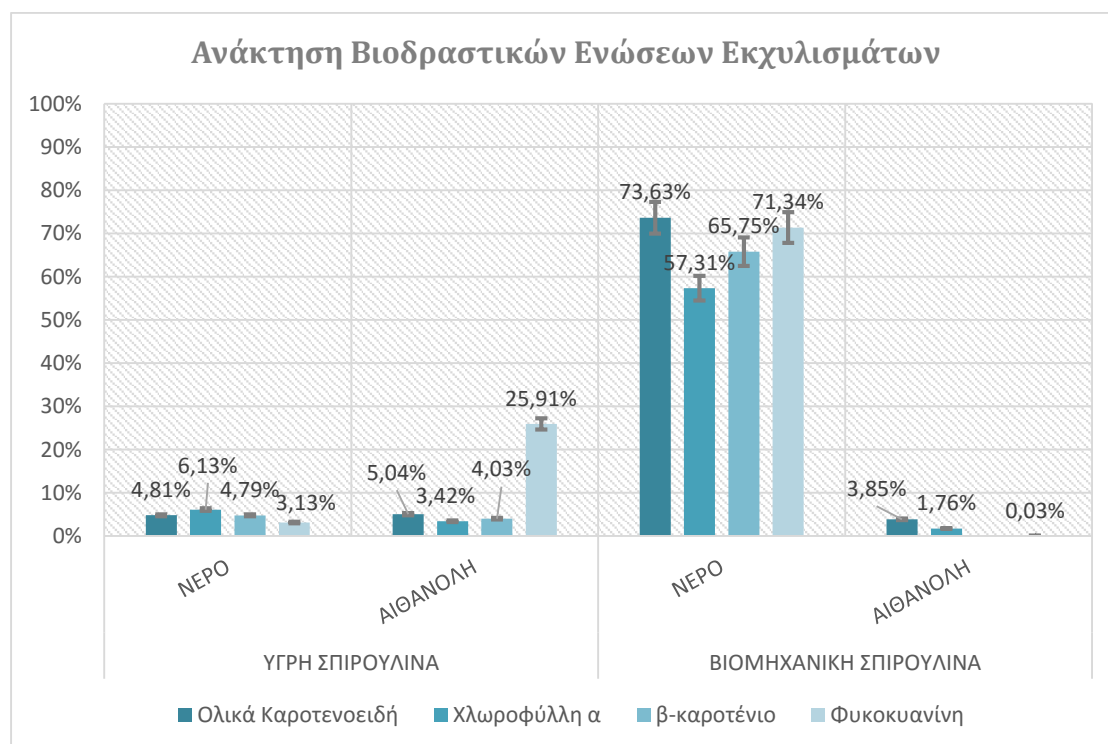
Το νερό ως πολικός διαλύτης είναι αναμενόμενο να εμφανίζει τα καλύτερα αποτελέσματα από όλους τους διαλύτες, καθώς εμφανίζει τις καλύτερες αποδόσεις στις χρωστικές και απορροφάει τα περισσότερα φαινολικά, που μπορούν να ανιχνευθούν από την μέθοδο μέτρησης που εφαρμόζεται. Επιπρόσθετα, το νερό παρουσιάζει καλύτερη δράση στην βιομηχανική μορφή από ότι στην νωπή μορφή του μικροφύκους.

Το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση της αιθανόλης και της ακετόνης, όπου το εσωτερικό νερό της νωπής βιομάζας δρα σαν συνδιαλύτης με τους προαναφερθέντες διαλύτες και οδηγεί στην αύξηση της απόδοσης και άρα στην αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα της Σπιρουλίνας μπορεί να αξιολογηθεί και από την αλλαγή της έντασης του μοβ χρώματος του DPPH, καθώς όσο περισσότερη είναι η μείωση της συγκέντρωσής του, τόσο περισσότερο εξασθενεί το χρώμα. Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης οφείλεται στην αντίδραση μεταξύ του DPPH και του ατόμου του υδρογόνου (Agustini et al. 2015).

8.2.3.6. Ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων

Για την καλύτερη σύγκριση των διαλυτών και ανάδειξη του βέλτιστου διαλύτη, είναι σημαντικό να φανεί το ποσοστό των βιοδραστικών ενώσεων που ανακτά ο καθένας κατά την έκχύλιση (Διάγραμμα 17). Επειδή οι μόνοι διαλύτες που μπόρεσαν να ανιχνευθούν είναι το νερό και η αιθανόλη, συγκρίνονται αυτοί οι δύο μεταξύ τους για την υγρή και ξηρή Σπιρουλίνα.



Διάγραμμα 17. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α, του β-καροτενίου και της φυκοκυανίνης από τα εκχυλίσματα της υγρής και ξηρής *Spirulina Platensis*

Το νερό είναι ο διαλύτης που επιτυγχάνει την μεγαλύτερη ανάκτηση. Βέβαια, αυτό συμβαίνει στην βιομηχανική βιομάζα, η οποία έχει ήδη υποβαθμιστεί με την ξήρανση, όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 8.3.1. Οι βιοδραστικές ενώσεις είναι σημαντικά μειωμένες σε σχέση με την υγρή πρώτη ύλη και το νερό φαίνεται να ανακτά τις περισσότερες από αυτές.

Τουναντίον, στην υγρή Σπιρουλίνα καλύτερα αποτελέσματα έχει η αιθανόλη, με μικρές διαφορές από το νερό, εκτός από την ανάκτηση της φυκοκυανίνης, όπου το ποσοστό είναι πολύ μεγάλο.

8.4. Συμπεράσματα

Συγκεντρωτικά, συγκρίνοντας τα είδη ξήρανσης, καλύτερη μέθοδος για την ανάκτηση των περισσότερων ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών είναι η ατμοσφαιρική ξήρανση, ενώ για την ανάκτηση περισσότερης φυκοκυανίνης είναι η λυοφιλίωση. Παρόλα αυτά, λόγω αυξημένου χρόνου που χρειάζονται τα δύο είδη ξήρανσης, επιλέχθηκε να μελετηθεί η βιομηχανική ξήρανση, μια μέθοδος γρήγορη, αρκετά αποτελεσματική και εφαρμοζόμενη στις σύγχρονες βιομηχανικές συνθήκες.

- Στόχος της ενότητας 8.3.2. ήταν η σύγκριση των διαλυτών του νερού, αιθανόλης, ακετόνης και εξάνιου, με τους πρώτους δύο να μπορούν να εφαρμοστούν στα συστήματα τροφίμων και τους τελευταίους να είναι ακατάλληλοι για χρήση στα τρόφιμα.
- Καλύτεροι διαλύτες για την εκχύλιση της υγρής Σπιρουλίνας και την δημιουργία διαλυμάτων πλούσιων σε βιοδραστικές ενώσεις αποδείχθηκαν η αιθανόλη, αλλά και το νερό, το οποίο όμως δεν κατάφερε να συγκεντρώσει στα εκχυλίσματά του μεγάλη ποσότητα φυκοκυανίνης.
- Όσον αφορά την βιομηχανική Σπιρουλίνα, ως καλύτερος διαλύτης αξιολογήθηκε το νερό που ανάκτησε σε πολύ μεγάλα ποσοστά όσες χρωστικές παρέμειναν μετά την βιομηχανική ξήρανση στην βιομάζα.
- Διαλύτες, όπως το εξάνιο και η ακετόνη δεν είχαν καλά αποτελέσματα, ούτε στην υγρή, ούτε στην βιομηχανική βιομάζα λόγω μη πολικότητας.
- Εκτός, όμως, από τις πολύ καλές αποδόσεις της αιθανόλης και του νερού, το μεγάλο πλεονέκτημα κατά την χρήση τους είναι η δυνατότητα διάθεσης των υπολειμμάτων εκχύλισής τους σε άλλες εφαρμογές, όπως οι υδατοκαλλιέργειες. Η αιθανόλη έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλής για τα τρόφιμα, για αυτό και συνίσταται η χρήση της για εκχύλιση μικροφυκών, η οποία θα είναι ασφαλής και για περαιτέρω επεξεργασία (Agustini et al., 2015). Παρόλα αυτά οι ποσότητες που πρέπει να βρίσκεται στα υπολείμματα είναι περιοριστικές. Το νερό, όμως, αποτελεί έτσι κι αλλιώς φύση των μικροφυκών και ενδείκνυται γιατί τα πέλετ του μπορούν να διατεθούν αυτούσια για άλλες χρήσεις, χωρίς κανέναν περιορισμό συγκέντρωσης μέσα σε αυτά.

Κεφάλαιο 9. *Chlorella Vulgaris*

9.1. Υλικά

Η *Chlorella Vulgaris* παραλήφθηκε από την εταιρία Μεσογειακή Βιοεπιστημονική με έδρα την Χίο σε υγρή μορφή (διάλυμα πάστας) με έντονο πράσινο χρώμα και ποσοστό υγρασίας $70,38 \pm 3,42\%$. Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό, το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και η αιθανόλη παραλήφθηκαν από την εταιρία Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο). Η ρίζα 2,2-διφαινυλο-πικρυλ υδραζύλιο (DPPH) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich.

9.2. Μέθοδοι

9.2.1. Ξήρανση

Δείγματα νωπής Χλωρέλλας ξηράθηκαν με δύο πολύ γνωστές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ξήρανσης:

- την λυοφιλίωση (όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.1.)
- την επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα: Χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός φούρνος (Binder ED115, 230V, 1,6 KW) σε θερμοκρασία 60°C για 12 ώρες. Η βιομάζα τοποθετήθηκε στον φούρνο σε λεπτές στρώσεις πάχους 1-5 mm πάνω σε αντικολλητικό χαρτί ψησίματος.

9.2.2. Εκχύλιση

Τα δείγματα της νωπής και της ξηρής *Chlorella Vulgaris* εκχυλίστηκαν με την μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας τρεις βρώσιμους διαλύτες: φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), νερό και αιθανόλη. Οι εκχυλίσεις με υπερήχους διεξήχθησαν στο λουτρό υπερήχων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China). Τα δείγματα (ξηρό βάρος: 2,5 γραμμάρια) τοποθετούνταν στο δοχείο εκχύλισης (beaker) μαζί με τον διαλύτη (50 ml), με αναλογία στερού/διαλύτη: 1 γραμμάριο ξηρής βιομάζας /20 ανά ml διαλύτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε συχνότητα 25 kHz, στα 450 Watt και σε θερμοκρασία 30 °C και διαρκούσαν 5 min.

Περίληπτικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, οι συνθήκες εκχύλισης, καθώς και οι βιοδραστικές ενώσεις, των οποίων το περιεχόμενο αξιολογήθηκε, παρουσιάζονται για το μικροφύκος *Chlorella Vulgaris* στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος *Chlorella Vulgaris* (CV)

Μικροφύκος	Διαλύτες	Συνθήκες Εκχύλισης	Βιοδραστικές Ουσίες
Chlorella Vulgaris (CV)	Buffer Νερό Αιθανόλη	25 kHz 50 ml διαλύτη Ξηρό Βάρος CV:2,5 g 450 W 50%P t=5 min	Ολικά Καροτενοειδή Χλωροφύλλες Β- καροτένιο

Η απόδοση της εκχύλισης εκφράστηκε ως ποσοστό του ξηρού βάρους του εκχυλίματος που αποκτήθηκε προς το ξηρό βάρος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Απόδοση Εκχύλισης % = (Ξηρό Βάρος Εκχυλίματος / Ξηρό Βάρος Δείγματος) *100%

9.2.3. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου

9.2.3.1. Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών

Το περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου Jeffrey (Jeffrey et al. 1997), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.1.

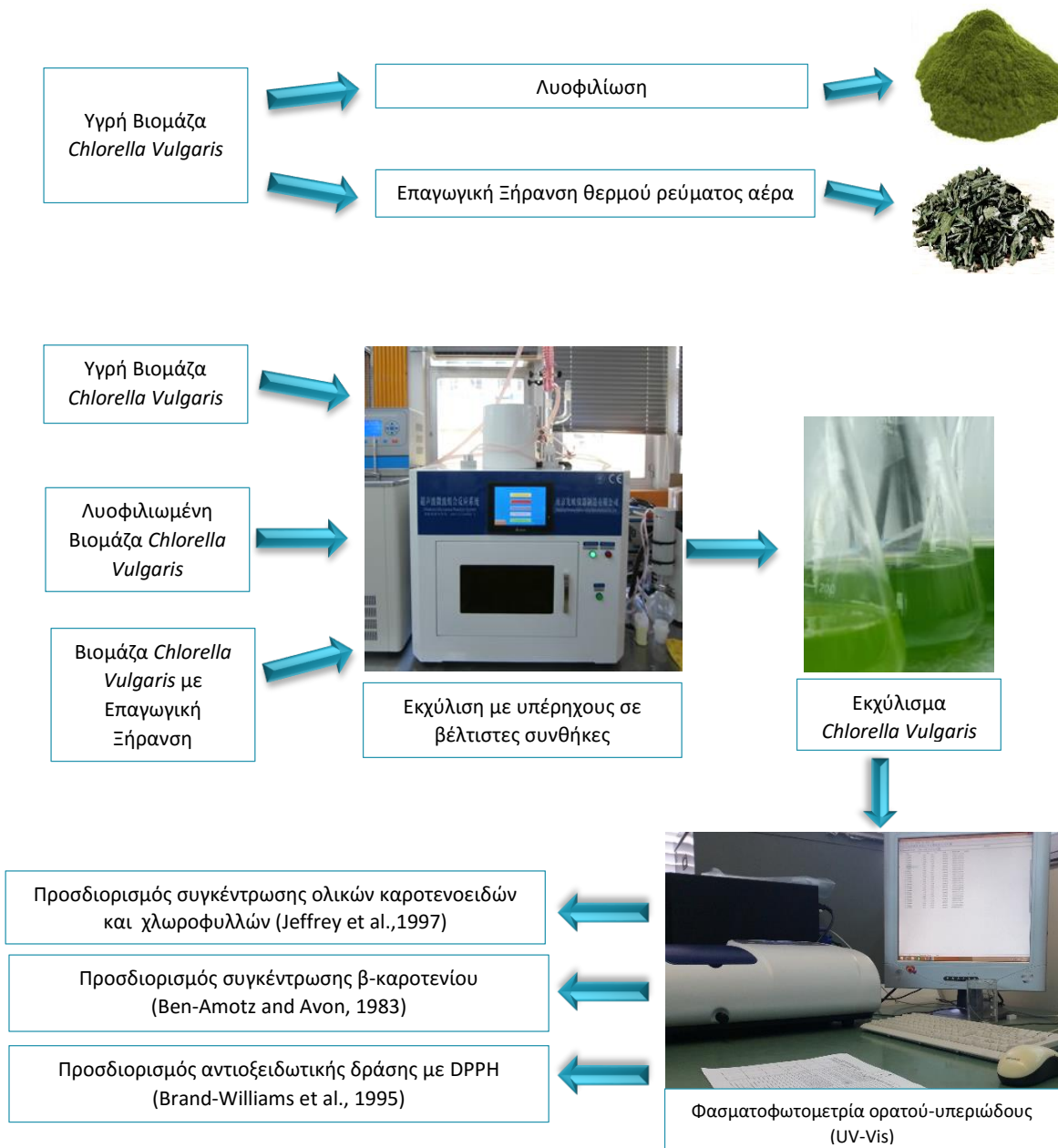
9.2.3.2. Προσδιορισμός β- καροτενίου

Το περιεχόμενο σε β- καροτένιο εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου των Ben Amotz & Avron 1983 (Ben-Amotz & Avron 1983), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.2.

9.2.3.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης με DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας 2,2- διφαινυλο- 1- πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH•)(Brand-Williams et al. 1995). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.4.

Περίληπτικά, το διάγραμμα ροής των διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν στην υγρή βιομάζα της *Chlorella Vulgaris* παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 3. Διάγραμμα Ροής Διεργασιών που ακολουθήθηκαν κατά την επεξεργασία της βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

9.3.Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

9.3.1. Επίδραση της ξήρανσης στα βιοδραστικά χαρακτηριστικά

Τα δείγματα της υγρής Χλωρέλλας πριν από οποιαδήποτε ξήρανση βρίσκονταν σε διάλυμα πάστας με έντονο πράσινο χρώμα και ποσοστό υγρασίας $70,38 \pm 3,42\%$.

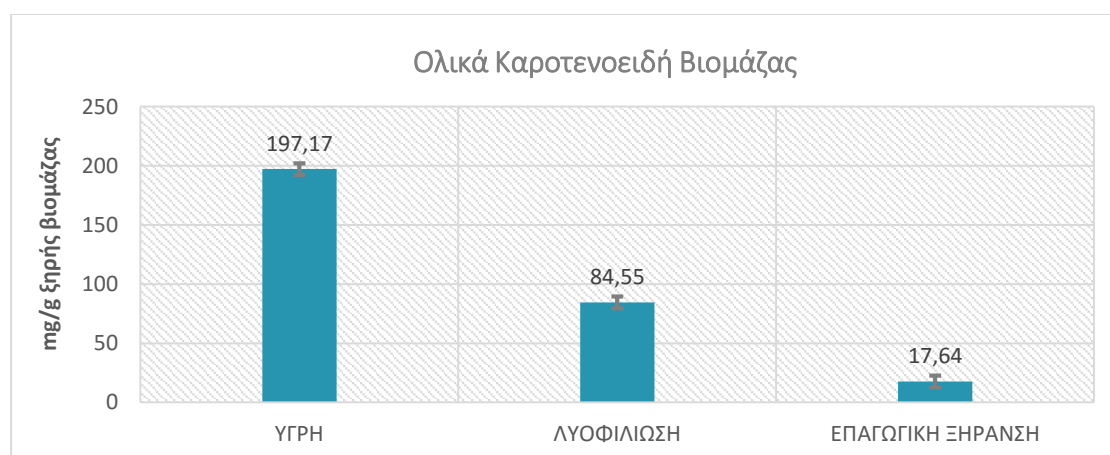
Μετά την λυοφιλίωση, τα δείγματα λήφθηκαν σε μορφή σκόνης με έντονο πράσινο χρώμα, θρυμματίζονταν εύκολα και η περιεχόμενη υγρασία τους ήταν μειωμένη κατά πολύ με την τιμή $0,88 \pm 0,05\%$.

Τέλος, η επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα έδωσε δείγματα σε μορφή νιφάδων και με πολύ σκούρο χρώμα (καφέ) και αυτό γιατί οι πρωτεΐνες της είχαν μετουσιωθεί και ένα μέρος των πολυσακχαριτών της είχαν καεί. Η περιεχόμενη υγρασία υπολογίστηκε στο $3,58 \pm 0,19\%$, τιμή μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της λυοφιλίωσης γιατί με αυτό το είδος ξήρανσης επιτυγχάνεται αφυδάτωση της επιφάνειας, ενώ στο εσωτερικό παραμένει ακόμα κάποιο ποσοστό υγρασίας.

Πέρα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, όμως, είναι χρήσιμο να μελετηθεί και η αλλαγή που επιφέρει η κάθε μέθοδος ξήρανσης στο περιεχόμενο σε βιοδραστικές ενώσεις.

9.3.1.1. Ολικά Καροτενοειδή

Οι μετρήσεις των ολικών καροτενοειδών της Χλωρέλλας για τις διάφορες ξηράσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18.



Διάγραμμα 18. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών στα διάφορα είδη βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

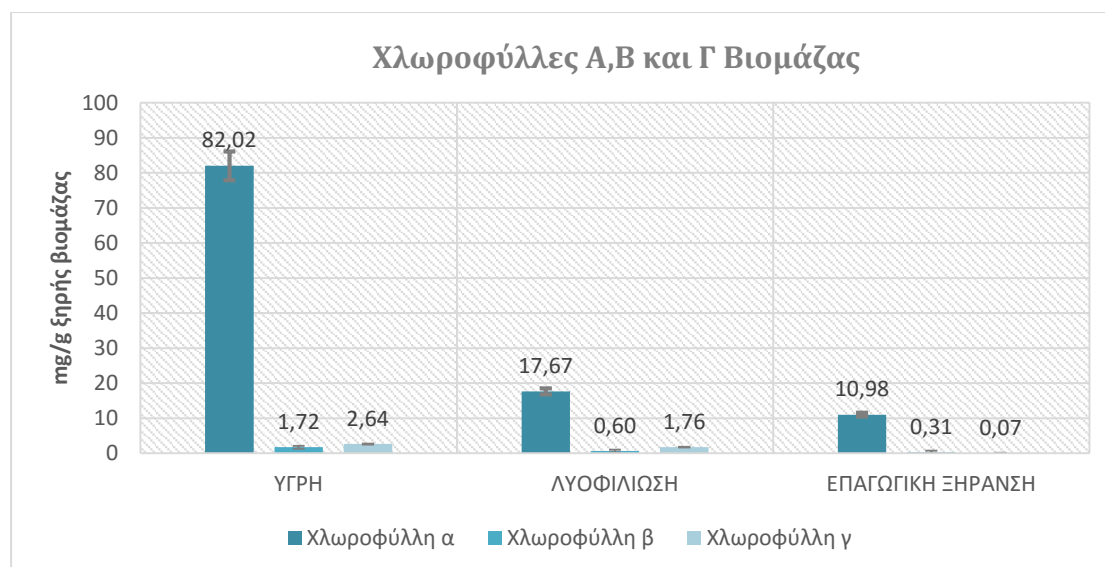
Όπως ήταν αναμενόμενο, το περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή μειώνεται σημαντικά με την εφαρμογή της ξήρανσης. Τα ολικά καροτενοειδή είναι φωτοευαίσθητες ενώσεις και επηρεάζονται πολύ από την θερμοκρασία και τον χρόνο ξήρανσης. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ξήρανσης, η λυοφιλίωση είναι προφανώς καλύτερη. Επειδή η θερμοκρασία που εφαρμόζεται στην επαγωγική ξήρανση μπορεί να φτάσει και τους 60°C και η επιφάνεια να υπερθερμανθεί, οι βιοδραστικές ενώσεις υποβαθμίζονται (Orikasa et al. 2014), με αποτέλεσμα απώλειας των καροτενοειδών σε ποσοστό άνω του 90%.

Το περιεχόμενο της Χλωρέλλας σε ολικά καροτενοειδή σε σχέση με το αντίστοιχο περιεχόμενο της Σπιρουλίνας (παράγραφος 8.3.1., διάγραμμα 1) είναι ακριβώς ίδιο και βέβαια και τα δύο περιεχόμενα είναι υψηλά. Για αυτό και τα δύο μικροφύκη είναι

οι πιο γνωστές πηγές καροτενοειδών. Η Χλωρέλλα έχει την τάση να συσσωρεύει καροτενοειδή ως αναπόσπαστο κομμάτι της βιομάζας της (Guedes et al. 2011).

9.3.1.2. Χλωροφύλλες

Οι συγκεντρώσεις των χλωροφύλλων α, β και γ, όπως αυτές μετρήθηκαν για τις διάφορες μεθόδους ξήρανσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο Jeffrey (Jeffrey et al. 1997) εμφανίζονται στο Διάγραμμα 19.



Διάγραμμα 19. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α,β και γ στα διάφορα είδη βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

Η μείωση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών ακολουθεί την ίδια πορεία με τα ολικά καροτενοειδή, με την διαφορά ότι η πτώση της τιμής των πρώτων με την επιβολή της ξήρανσης, ανεξαρτήτου του είδους της, είναι κατακόρυφη. Αυτό συμβαίνει λόγω της υποβάθμισης των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες σε υψηλές θερμοκρασίες (An-Erl King et al. 2001; Therdthai & Zhou 2009)

Επίσης, ενώ στα καροτενοειδή η διαφορά τιμών μεταξύ λυοφιλίωσης και επαγωγικής ξήρανσης είναι αρκετά μεγάλη, στις χλωροφύλλες οι δύο μέθοδοι δεν έχουν σημαντική διαφορά. Αυτό παρατηρήθηκε και για το μικροφύκος Σπιρουλίνα στο κεφάλαιο 8. Όπως τα καροτενοειδή, έτσι και οι χλωροφύλλες είναι ευαίσθητες σε υποβάθμιση (degradation) κατά την ξήρανση, αλλά οι ξηράνσεις τους δίνουν εφάμιλλα αποτελέσματα (Onayemi & Badifu 1987). Έτσι, συμπεραίνεται πως η εφαρμογή ξήρανσης επηρεάζει πολύ τις χλωροφύλλες, αλλά η μέθοδός της που εφαρμόζεται κάθε φορά δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο γιατί οι χλωροφύλλες δεν είναι τόσο θερμοευαίσθητες όσο τα καροτενοειδή.

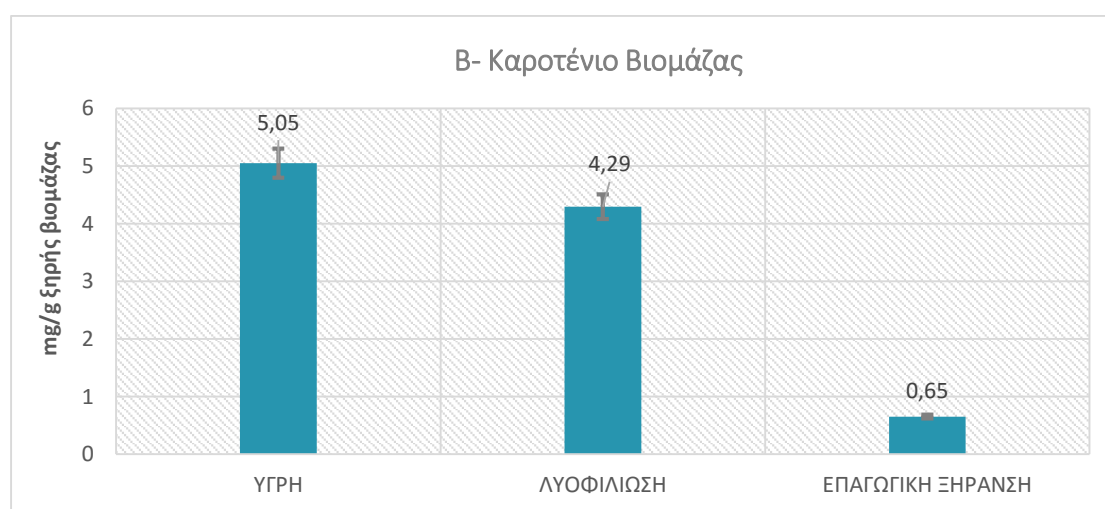
Συγκρίνοντας το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη α και στα δύο μικροφύκη, Σπιρουλίνα και Χλωρέλλα, παρατηρούμε ότι στην Σπιρουλίνα η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη α είναι τετραπλάσια, γεγονός που οφείλεται στις συνθήκες καλλιέργειας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το μικροφύκος Σπιρουλίνα θεωρείται μία από τις καλύτερες πηγές

χλωροφύλλης(Danesi et al. 2004), λόγω όμως παρουσίας της φυκοκυανίνης επικρατεί ο μπλε χρωματισμός.

Τέλος, παρατηρείται πως η συγκέντρωση των χλωροφυλλών β και γ είναι πολύ μικρή στην χλωρέλλα, ακόμη και στην νωπή βιομάζα. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει για την Σπιρουλίνα, όπου παρόλο που οι χλωροφύλλες β και γ δεν είναι κυρίαρχες, η συγκέντρωσή τους δεν είναι τόσο κατώτερη της χλωροφύλλης α, όσο στην περίπτωση αυτή.

9.3.1.3. Β-Καροτένιο

Οι μετρήσεις του βιοδραστικού περιεχομένου ολοκληρώνονται με το β-καροτένιο, που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 20.



Διάγραμμα 20. Συγκέντρωση β-καροτενίου στα διάφορα είδη βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

Η πτωτική πορεία είναι ίδια και σε αυτήν την περίπτωση, με την λυοφιλίωση να αποτελεί καλύτερη μέθοδο ξήρανσης και μάλιστα να καταφέρνει να ανακτήσει μεγάλο ποσοστό β-καροτενίου, όπως θα φανεί και στο Διάγραμμα 21 στην συνέχεια. Το ποσοστό του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή παρουσιάζεται στον πίνακα 15.

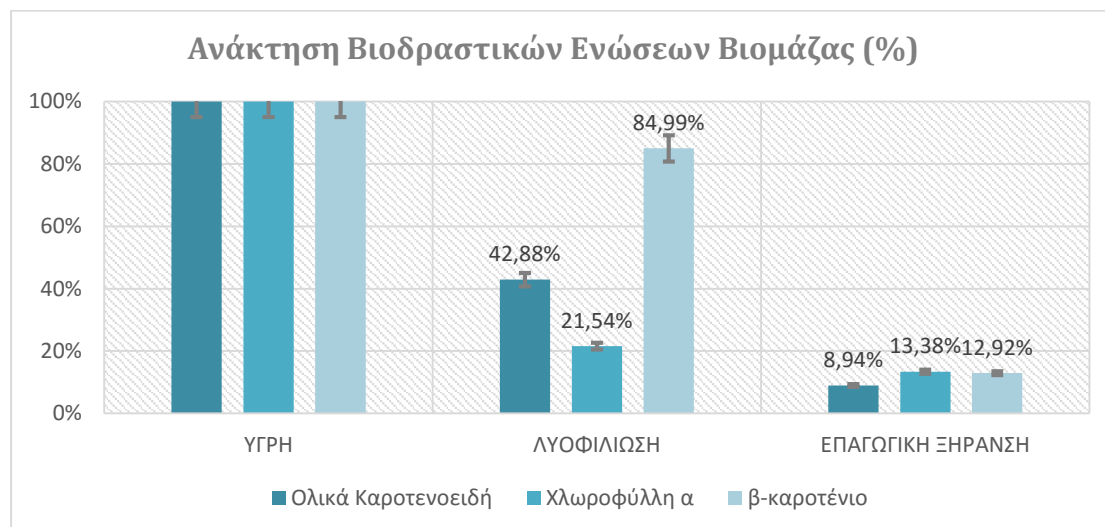
Πίνακας 15. Αναλογία β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή των εκχυλισμάτων της *Chlorella Vulgaris*

Είδος Βιομάζας	Αναλογία β-καροτενίου στα Ολικά Καροτενοειδή (%)
Υγρή	2,56±0,11
Λυοφιλιωμένη	5,08±0,25
Επαγωγική	3,70±0,19

Το ποσοστό βέβαια βρίσκεται σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα γιατί το κυρίαρχο καροτενοειδές στην *Chlorella Vulgaris* είναι η λουτεΐνη(Guedes et al. 2011).

9.3.1.4. Ανάκτηση Βιοδραστικών Ενώσεων Βιομάζας

Η σύγκριση των μεθόδων ξήρανσης μπορεί να γίνει πιο κατανοητή στο συγκεντρωτικό διάγραμμα (21) ανάκτησης όλων των βιοδραστικών ενώσεων, θεωρώντας ότι η συγκέντρωσή τους στην υγρή Σπιρουλίνα είναι 100%.



Διάγραμμα 21. Ανάκτηση ολικών καροτενοειδών, χλωροφύλλης α και β-καροτενίου στα διάφορα είδη βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

Συμπερασματικά, η επαγωγική ξήρανση με ρεύμα θερμού αέρα έχει απώλειες χρωστικών της τάξης του 90% κατά προσέγγιση. Οι αυξημένες θερμοκρασίες της μεθόδου και ο θερμός αέρας που αφυδατώνει και υπερθερμαίνει την επιφάνεια των δειγμάτων είναι υπέθυνοι για την πολύ μεγάλη υποβάθμιση των θρεπτικών. Ειδικά, οι χρωστικές που μελετήθηκαν είναι θερμοευαίσθητες, άρα η υποβάθμισή τους γίνεται σε υψηλότερο βαθμό.

Η λυοφιλίωση, από την άλλη, διατηρεί σε σημαντικό ποσοστό την βιολογική αξία και το περιεχόμενο σε χρωστικές της Χλωρέλλας, που είναι ένα τρόφιμο υψηλής αξίας. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν οι χλωροφύλλες, η ανάκτηση των οποίων αγγίζει μόνο το 21,54%, αλλά, όπως αποδείχθηκε και για την Σπιρουλίνα στην ενότητα 8.4.1., οι χλωροφύλλες υποβαθμίζονται έτσι και αλλιώς, λόγω οξειδωσης, οποιαδήποτε ξήρανση και να εφαρμοστεί.

9.3.2. Επίδραση της περιεχόμενης υγρασίας και του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο

2,5 γραμμάρια των τριών ειδών βιομάζας: νωπή, βιομάζα που έχει υποστεί λυοφιλίωση και βιομάζα στην οποία έχει εφαρμοστεί επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα, εκχυλίστηκαν με 50 ml τριών διαφορετικών διαλυτών: φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), νερό και αιθανόλη. Το νερό και η αιθανόλη είναι συνήθεις χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην εκχύλιση της *Chlorella Vulgaris* με καλές αποδόσεις (Kwang et al. 2010; Plaza, Santoyo, Jaime, Avalo, Cifuentes, Reglero, Garcia-Blairsy Reina, et al. 2012), για αυτό και επιλέχθηκαν στα πειράματα. Από την άλλη, το

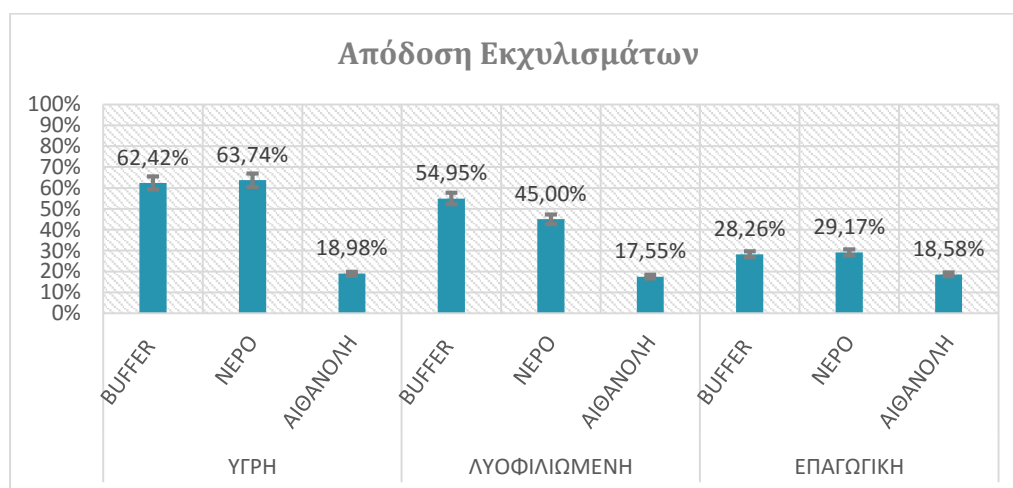
φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) είναι υδατικό διάλυμα με σταθερό pH ίσο με 7.

Οι τρεις διαλύτες επιλέχθηκαν, λόγω της διαφοράς που έχουν στην πολικότητα και το pH, ώστε να μελετηθεί πως αυτοί οι διαφορές σε αυτούς τους δύο παράγοντες επηρεάζουν την απόδοση και την ανάκτηση σε βιοδραστικά συστατικά κατά την εκχύλιση. Τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Να σημειωθεί πως εφεξής η βιομάζα ξηραμένη με επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα θα αναφέρεται ως επαγωγική βιομάζα.

Πίνακας 16. Η ποσότητα εκχυλισμάτων και πέλετ και οι αποδόσεις αυτών για τα διάφορα είδη βιομάζας της *Chlorella Vulgaris*

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ			PELLET	
		ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ml)	ΞΗΡΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ(g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)	PELLET (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)
ΥΓΡΗ	BUFFER	43,60	1,10	62,42	0,56	32,07
	ΝΕΡΟ	44,10	0,54	63,74	0,14	16,77
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	42,80	0,51	18,98	2,31	77,09
ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΗ	BUFFER	44,60	1,37	54,95	1,15	46,22
	ΝΕΡΟ	44,20	1,12	45,00	1,12	45,39
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	45,60	0,14	17,55	0,54	66,51
ΕΠΑΓΩΓΙΚΗ	BUFFER	43,30	0,79	28,26	1,40	50,20
	ΝΕΡΟ	40,10	0,82	29,17	1,37	48,76
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	44,20	0,52	18,55	1,96	69,96

Η ποσότητα των ολικών εκχυλισμάτων σε ml φαίνεται να είναι παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις. Για την καλύτερη σύγκριση των αποδόσεων, σχεδιάστηκαν τα Διαγράμματα 22, όπου παρουσιάζεται η απόδοση των εκχυλισμάτων (%) και 23 με την απόδοση των πέλετ (%).

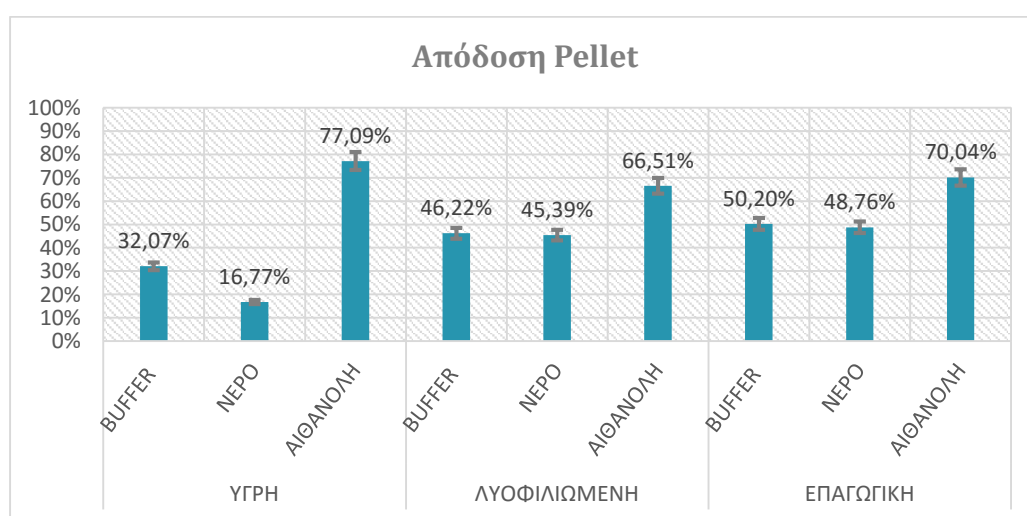


Διάγραμμα 22. Αποδόσεις των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Αρχικά, συγκρίνοντας τους διαλύτες, παρατηρείται ότι το buffer και το νερό έχουν παρόμοιες αποδόσεις, πολύ μεγαλύτερες της αιθανόλης. Το νερό, όπως εξηγήθηκε και στην ενότητα 8.3.2., είναι πολικός διαλύτης με διηλεκτρική σταθερά 80 και με μικρά μόρια, που μπορούν να εισχωρήσουν εύκολα στον φυτικό ιστό της Χλωρέλλας. Από την άλλη, το buffer είναι υδατικό διάλυμα με παρόμοιες ιδιότητες με το νερό και προτείνεται βιβλιογραφικά γιατί ενισχύει την λύση του κυττάρου και δεν μετουσιώνει τα εκχυλίσματα συστατικά. Αν και η αιθανόλη είναι συνήθης διαλύτης για την εκχύλιση της Χλωρέλλας, εμφανίζοντας μεγάλες αποδόσεις σε χρωστικές (Kwang et al. 2010; Kwang et al. 2008), αποδεικνύεται ότι το μεγάλο μέγεθος των μορίων της και η μικρή διηλεκτρική σταθερά της (24,55) σε σχέση με το νερό, εμποδίζουν την εισχώρησή της μέσα στον ιστό της Χλωρέλλας. Η ανωτερότητα του νερού έναντι της αιθανόλης στην απόδοση της εκχύλισης, παρατηρήθηκε και στα πειράματα των M. Plaza και άλλων συνεργατών του, όταν σύγκριναν το νερό, την αιθανόλη και το εξάνιο. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από το ότι η χημική σύνθεση της *Chlorella Vulgaris* κυριαρχείται από ενώσεις μέσης ή υψηλής πολικότητας, για αυτό και αυτές οι ενώσεις εκχυλίζονται κυρίως από πολικούς διαλύτες (Plaza, Santoyo, Jaime, Avalo, Cifuentes, Reglero, García-Blairsy Reina, et al. 2012).

Επίσης, όπως παρατηρήθηκε στην Σπιρουλίνα ότι η απόδοση της αιθανόλης αυξάνεται στην νωπή βιομάζα, όπου το νερό δρα σαν συνδιαλύτης, το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της Χλωρέλλας.

Τέλος, οι αποδόσεις του buffer και του νερού, μειώνονται με την εφαρμογή της ξήρανης. Ιδιαίτερα στην επαγωγική ξήρανη, η απόδοση των δύο εκχυλισμάτων έχει σχεδόν μισή τιμή από την υγρή βιομάζα. Αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει γιατί στην επαγωγική ξήρανη, η επιφάνεια είναι εκτεθειμένη περισσότερο στο ρεύμα θερμού αέρα από ότι το εσωτερικό της Χλωρέλλας, με αποτέλεσμα την δημιουργία κρούστας (Lewicki 2006; Giri & Prasad 2007). Έτσι, η επιφάνεια του μικροφύκου γίνεται απροσπέλαστη στους διαλύτες κατά την εκχύλιση.

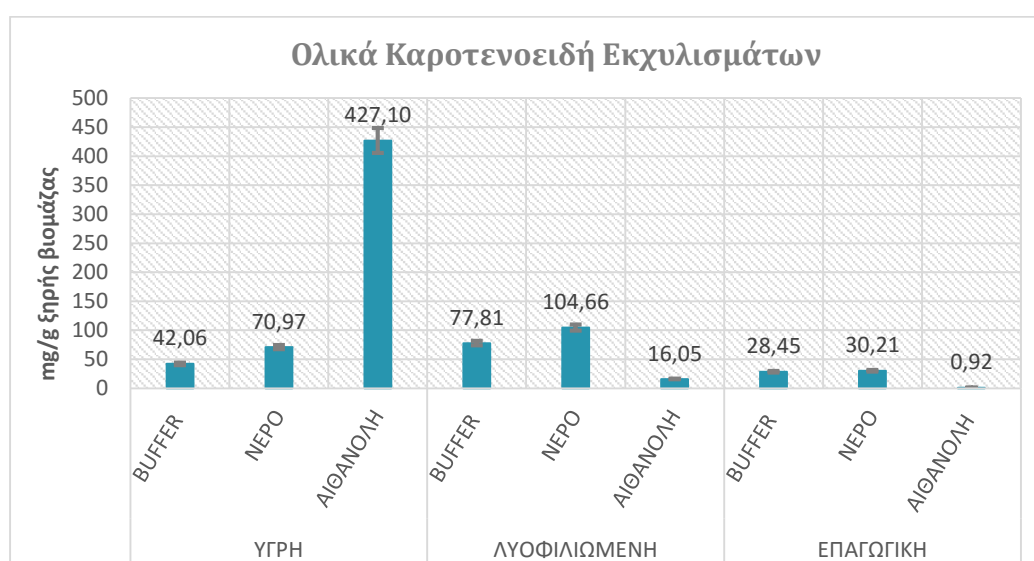


Διάγραμμα 23. Αποδόσεις των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Είναι φανερό πως όσο μεγαλύτερη είναι η απόδοση των εκχυλισμάτων, τόσο μικρότερη είναι η απόδοση των υπολειμμάτων εκχύλισης, για αυτό και τα πέλετ της αιθανόλης έχουν τις υψηλότερες αποδόσεις. Παρόλα αυτά, ενώ στην νωπή πρώτη ύλη που εκχυλίστηκε με νερό, θα ήταν αναμενόμενη μια τιμή κοντά στην τιμή των πέλετ του buffer, αυτό δεν συμβαίνει εξαιτίας της απώλειας που υπήρχε. Λόγω δυσκολίας διαχείρισης του υλικού, σημαντική ποσότητά του παρέμεινε στο δοχείο εκχύλισης και δεν μπόρεσε να ζυγιστεί.

9.3.2.1. Ολικά Καροτενοειδή

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συγκέντρωσης των ολικών καροτενοειδών εμφανίζονται στα Διαγράμματα 24 για τα εκχυλίσματα και 25 για τα αντίστοιχα υπολείμματα.



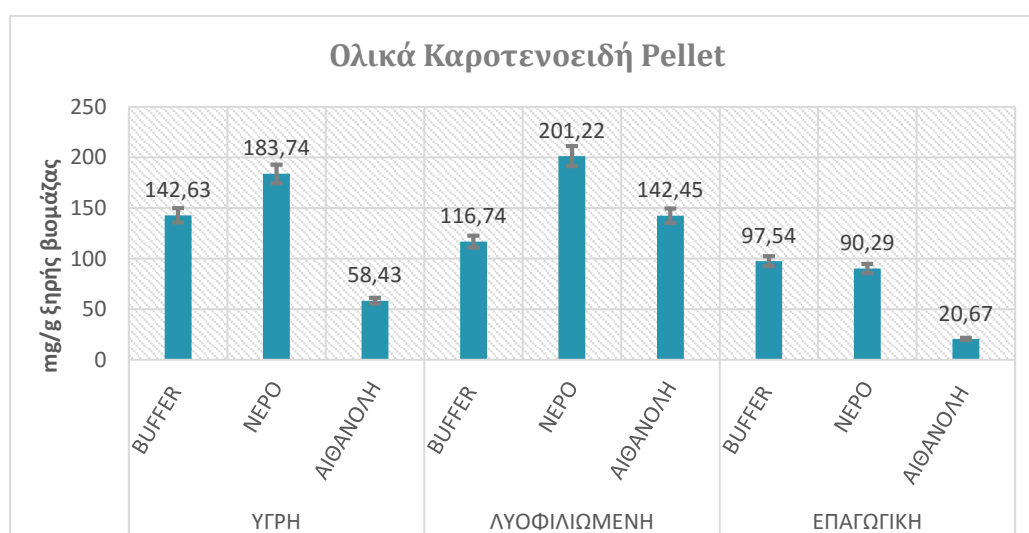
Διάγραμμα 24. Συγκέντρωση Ολικών Καροτενοειδών των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Ξεκινώντας από το Διάγραμμα 24, η αιθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης για την υγρή βιομάζα και το νερό για την λυοφιλιωμένη και την βιομάζα με επαγωγική ξήρανση. Ίδια ακριβώς εικόνα υπήρχε και για την Σπιρουλίνα στην ενότητα 8.3.2. Η αιθανόλη, παρά την μικρή απόδοση που επιτύγχανε στα διαλύματα γενικώς (Διάγραμμα 22), βλέπουμε ότι είναι πολύ εκλεκτική στα ολικά καροτενοειδή. Σε ακριβώς ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και ο H.C. Kwang, όταν σύγκρινε το εξάνιο, την ακετονη, την αιθανόλη και το νερό ως προς την απόδοση στα ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες και η αιθανόλη ήταν ο πιο αποδοτικός διαλύτης, ενώ το νερό ήταν συγκριτικά χειρότερο. Μάλιστα, το διάλυμα αιθανόλης 90% (με 10% νερό) ήταν ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης από όλους. Η υψηλή απόδοση της 90% αιθανόλης που προσδιορίστηκε ενδέχεται να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό των υδατοδιαλυτών ενώσεων της Χλωρέλλας (Kwang et al. 2010). Δηλαδή, η αιθανόλη, όταν βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον (όπως στην υγρή πρώτη ύλη που έχει πολλή υγρασία), μπορεί να ανακτήσει περισσότερα καροτενοειδή. Για αυτό, στις άλλες δύο πρώτες ύλες, τα αποτελέσματα είναι μέτρια.

Τουναντίον, το νερό και το ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργούν καλύτερα σε συνθήκες λυοφιλίωσης, όπου το εσωτερικό νερό της πρώτης ύλης έχει περιορισθεί σημαντικά στο $0,88 \pm 0,05\%$. Έτσι, το νερό ως διαλύτης δεν έχει ανταγωνισμό με το εσωτερικό νερό και η διάχυση γίνεται πιο αποτελεσματικά. Η καλύτερη απόδοση του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην λυοφιλωμένη βιομάζα το pH του παραμένει σταθερό, ενώ στην νωπή, αλλάζει γιατί έρχεται σε επαφή με την περιεχόμενη υγρασία με χαμηλότερο pH.

Στην περίπτωση της επαγωγικής ξήρανσης, το νερό εμφανίζει και πάλι τα καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τους δύο υπόλοιπους διαλύτες, όμως η συγκέντρωση των καρροτενοειδών είναι σαφώς μικρότερη από την περίπτωση της λυοφιλίωσης, αφού η ίδια η βιομάζα έχει υποβαθμιστεί σημαντικά.

Η καλύτερη αποτελεσματικότητα της αιθανόλης συγκριτικά με το νερό για την υγρή βιομάζα επιβεβαιώνεται από τις μελέτες του M. Plaza και των συνεργατών του, που βρήκαν ότι στα εκχυλίσματα του νερού δεν υπήρχαν σημαντικές ποσότητες καρροτενοειδών και χλωροφυλλών (Plaza, Santoyo, Jaime, Avalo, Cifuentes, Reglero, García-Blairsy Reina, et al. 2012).



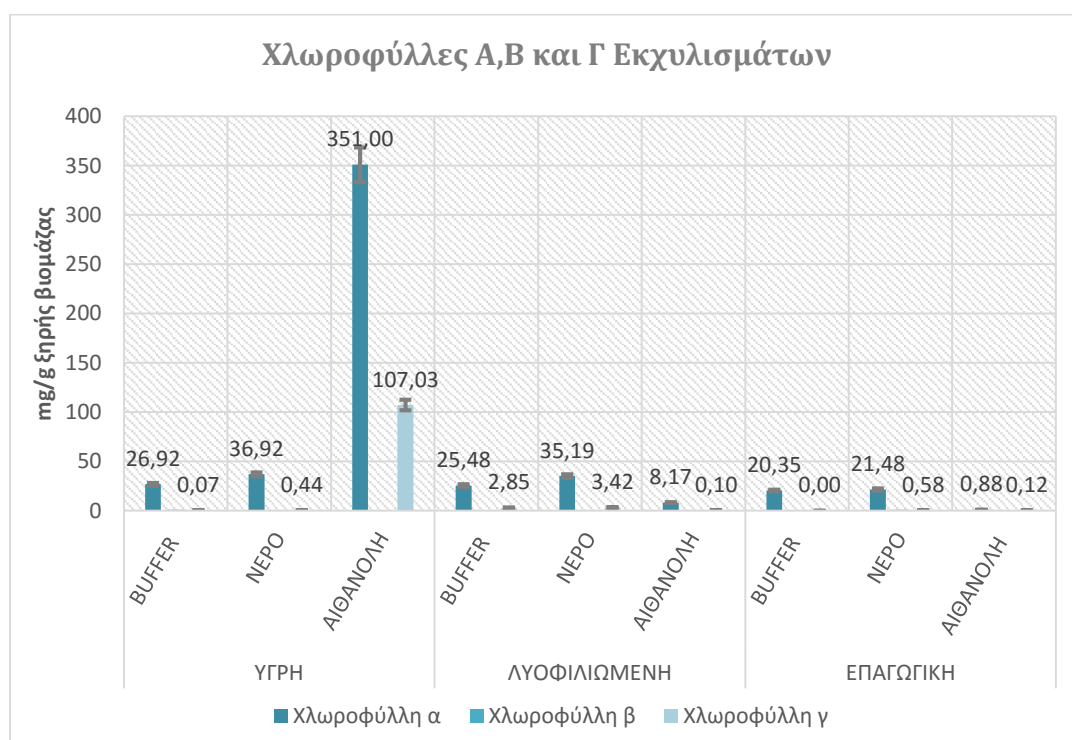
Διάγραμμα 25. Συγκέντρωση Ολικών Καρροτενοειδών των pellet της υγρής, λυοφιλωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Όσον αφορά το περιεχόμενο των πέλετ σε ολικά καρροτενοειδή, φαίνεται πως οι εκχυλίσες των πέντε λεπτών στις συνθήκες που αναλύθηκαν παραπάνω, αφήνουν σημαντικό μέρος των καρροτενοειδών στα πέλετ, ενώ στόχος είναι της εργασίας είναι η δημιουργία όσο το δυνατό πλουσιότερων εκχυλισμάτων. Παρόλα αυτά, επιλέγοντας τους κατάλληλους διαλύτες, όπως η αιθανόλη στην υγρή Χλωρέλλα, ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται. Επίσης, επειδή σκοπός είναι η εφαρμογή των διαδικασιών στην βιομηχανία, απαιτούνται γρήγορες και οικονομικές μέθοδοι, για αυτό και βέλτιστη μέθοδος θεωρείται η εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο.

Επιπλέον, το νερό, αλλά και το ρυθμιστικό διάλυμα, που γενικά εμφανίζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στα εκχυλίσματά τους, φαίνεται να έχουν άριστα αποτελέσματα και στα πέλετ τους. Το γεγονός ότι τα πέλετ είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις είναι σημαντικό, ιδιαίτερα για μια βιομηχανία που ασχολείται με τα εκχυλίσματα, γιατί συμβάλλει στην οικονομικότητα, αφού μπορούν να διατεθούν για άλλες χρήσεις, όπως οι υδατοκαλλιέργειες. Για αυτό και επιλέγονται διαλύτες που είναι δυνατό τα πέλετ τους να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων.

9.3.2.2. Χλωροφύλλες

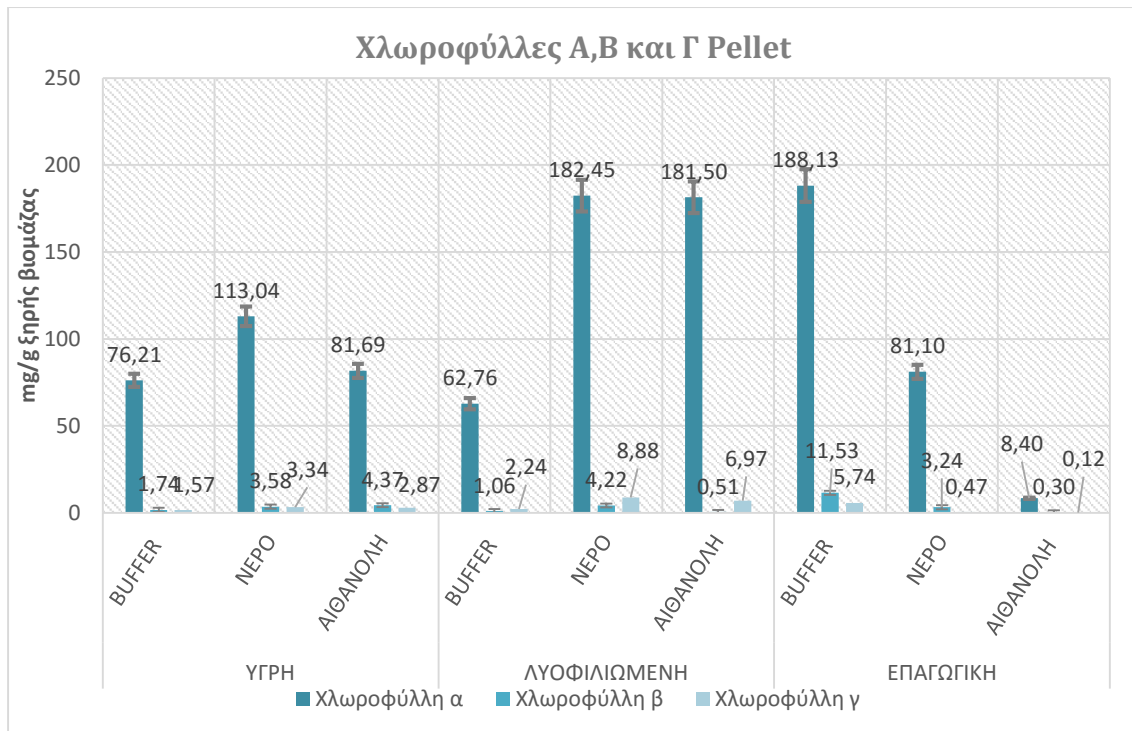
Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα εκχυλίσματα, όπως αυτή μετρήθηκε για τα τρία είδη βιομάζας και τα τρία συστήματα διαλυτών εμφανίζεται στο Διάγραμμα 26.



Διάγραμμα 26. Συγκέντρωση Χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Η εικόνα της χλωροφύλλης α είναι όμοια με αυτή των ολικών καροτενοειδών, που αναλύθηκαν διεξοδικά παραπάνω. Αξίζει να σχολιασθεί πως οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών β και γ είναι σχεδόν μηδενικές, με μοναδική εξαίρεση την υγρή πρώτη ύλη εκχυλισμένη με αιθανόλη, η χλωροφύλλη γ της οποίας φτάνει τα 107,03 mg/g ξηρού βάρους. Βέβαια, η μηδενική σχεδόν συγκέντρωση των δύο χλωροφυλλών βρέθηκε να υπάρχει και για την αυτούσια πρώτη ύλη στην Ενότητα 9.3.1. και πιο συγκεκριμένα στο Διάγραμμα 19.

Οι αντίστοιχες μετρήσεις στα υπολείμματα των εκχυλίσεων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 27.



Διάγραμμα 27. Συγκέντρωση Χλωροφυλλών α, β και γ των pellet της υγρής, λυοφιλωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Οι χλωροφύλλες για ακόμη μια φορά ακολουθούν την πορεία των καροτενοειδών και δεν χρειάζεται να γίνει περαιτέρω σχολιασμός.

9.3.2.3. Β-Καροτένιο

Από την φωτομέτρηση και τον υπολογισμό του περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε β-καροτένιο, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Ben Amotz & Ανρον 1983 (Ben-Amotz & Ανρον 1983) λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Διάγραμμα 28).



Διάγραμμα 28. Συγκέντρωση β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Το β-καροτένιο, όπως και οι χρωστικές που μελετήθηκαν παραπάνω, εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση όταν εκχυλίζεται η υγρή βιομάζα με την αιθανόλη.

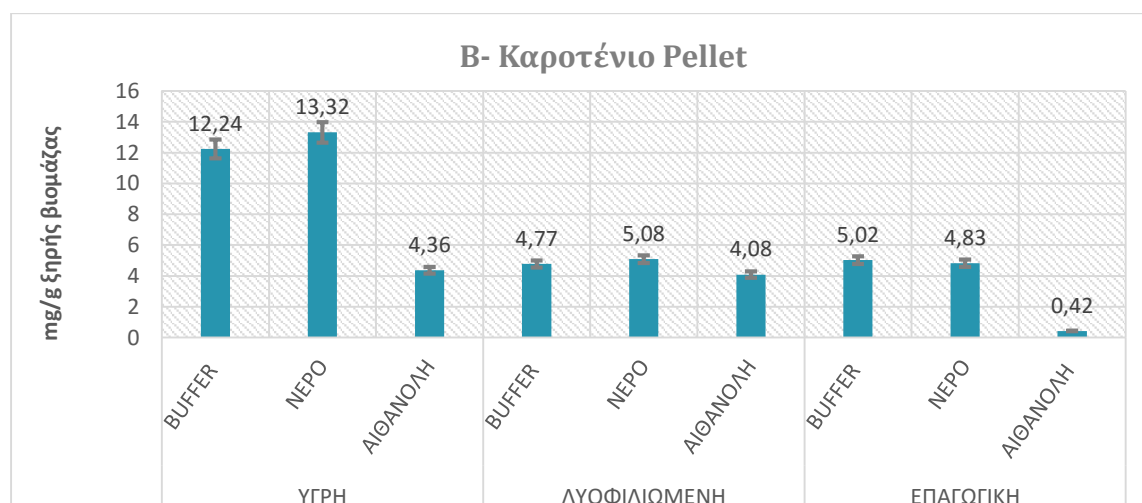
Γενικώς, η πορεία του β-καροτενίου ακολουθεί την πορεία των ολικών καροτενοειδών. Σε αυτό το σημείο, είναι ενδιαφέρον να υπολογιστεί το ποσοστό του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή, το οποίο παρουσιάζεται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Ποσοστό του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων της *Chlorella Vulgaris*

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΣΤΑ ΟΛΙΚΑ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ
ΥΓΡΗ	BUFFER	4,48±0,21%
	ΝΕΡΟ	3,90±0,20%
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	4,56±0,23%
ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΗ	BUFFER	4,09±0,21%
	ΝΕΡΟ	3,13±0,16%
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	15,23±0,95%
ΕΠΑΓΩΓΙΚΗ	BUFFER	1,91±0,09%
	ΝΕΡΟ	3,60±0,18%
	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	2,18±0,11%

Το β-καροτένιο δεν είναι το κυρίαρχο καροτενοειδές στην *Chlorella Vulgaris*, σε αντίθεση με την λουτεΐνη (Kwang et al. 2008). Αυτό επιβεβαιώνεται, αφενός από τα ποσοστά του στην βιομάζα αυτή καθ' αυτή, όπως φάνηκε στο Διάγραμμα 20 (Ενότητα 8.3.1.), και αφετέρου από το παραπάνω Διάγραμμα.

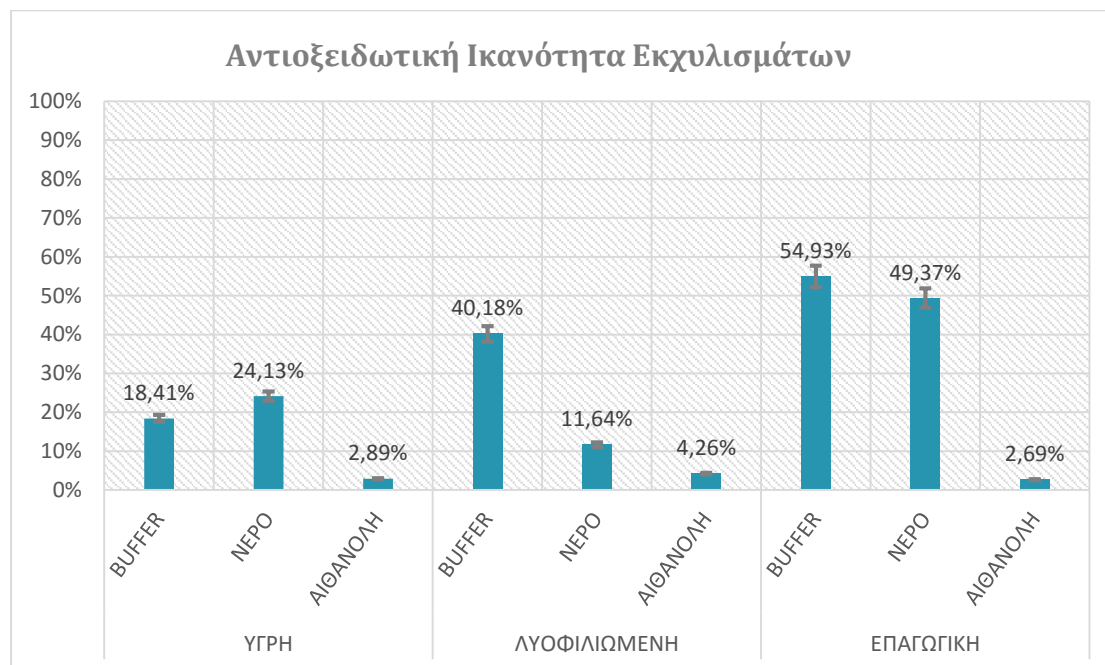
Το αντίστοιχα αποτελέσματα του περιεχομένου σε β-καροτένιο για τα πέλετ παριστάνονται στον Διάγραμμα 29, όπου και πάλι η εικόνα τους είναι όμοια με τα ολικά καροτενοειδή και τις χλωροφύλλες, κάτι που δείχνει επαναληψιμότητα στις μετρήσεις.



Διάγραμμα 29. Συγκέντρωση β-καροτενίου των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

9.3.2.4. Αντιοξειδωτική Δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, αλλά και των υπολειμμάτων της εκχύλισης, εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας 2,2- διφαινυλο- 1- πικρυλο- υδραζυλίου (DPPH•) (Brand-Williams et al. 1995) και προβάλλεται στο Διάγραμμα 30 για τα εκχυλίσματα και 31 για τα πέλετ.



Διάγραμμα 30. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

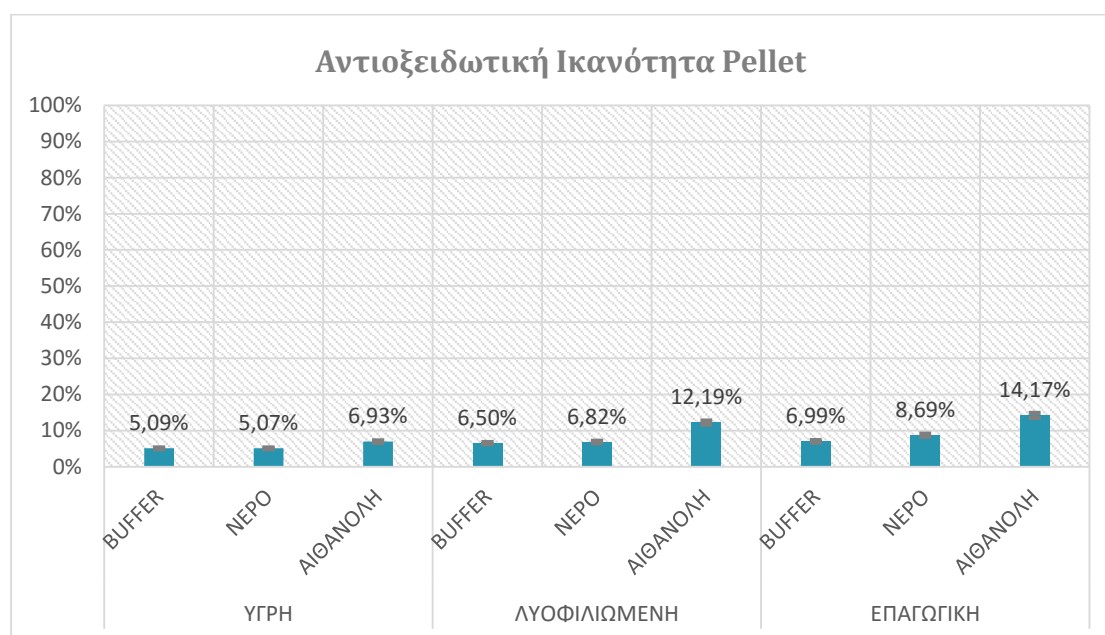
Γενικά, η αντιοξειδωτική δράση συνδέεται με βιοδραστικές ενώσεις, όπως τα καροτενοειδή, τα φαινολικά οξέα και τις χλωροφύλλες (Jaime et al. 2005). Επίσης, τα φαινολικά είναι γνωστά ως υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ενώ τα καροτενοειδή ως λιπόφιλα. Έτσι, τα φαινολικά οξέα διαλύονται περισσότερο στις πιο πολικές ενώσεις, όπως το νερό, και λιγότερο στην αιθανόλη.

Επειδή με την μέθοδο της δραστικής ρίζας DPPH δεν είναι αντιπροσωπευτική η ανίχνευση κάποιας σημαντικής δράσης των καροτενοειδών (Müller et al. 2011), γίνεται κατανοητό πως η αντιοξειδωτική δράση με το DPPH απευθύνεται στα φαινολικά (δευτερεύοντες μεταβολίτες) και όχι τόσο σε χρωστικές, όπως τα καροτενοειδή.

Αφού, λοιπόν, το νερό συγκεντρώνει περισσότερα φαινολικά οξέα από την αιθανόλη, όπως έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά, είναι λογικό η αντιοξειδωτική δράση της βιομάζας που έχει εκχυλιστεί με τον πρώτο διαλύτη να είναι υψηλότερη. Δηλαδή, παρόλο που η αιθανόλη συγκεντρώνει περισσότερα καροτενοειδή και χλωροφύλλες, η αντιοξειδωτική δράση της, όπως ορίζεται με την συγκεκριμένη μέθοδο, είναι μειωμένη για τους λόγους που εξηγήθηκαν.

Όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), αυτός ο διαλύτης παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η διαφορά που παρουσιάζεται ανάμεσα στα εκχυλίσματα του ρυθμιστικού διαλύματος και του νερού οφείλεται στην ικανότητα του πρώτου να λύει τις κυτταρικές δομές και να απελευθερώνει τις αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Τέλος παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική δράση μετά την ξήρανση είναι μεγαλύτερη από το αρχικό δείγμα, για τους διαλύτες του ρυθμιστικού διαλύματος και του νερού (εκτός από το νερό στην λυοφιλιωμένη βιομάζα). Η ίδια παρατήρηση γίνεται και από τον T. Orikasa και εξηγεί πως η θερμική ενέργεια κατά τη διάρκεια της ξήρανσης έχει τη δυνατότητα να σπάσει τις μοριακές δομές των ομοιοπολικών συμπλόκων και να απελευθερώσει ορισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες (Orikasa et al. 2014). Επίσης, κατά την ξήρανση τα κύτταρα στρεσάρονται και παράγουν περισσότερους μεταβολίτες για να αντισταθούν στην μεταβολή. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι πολικοί και ο συνδιασμός πολικών διαλυτών (νερό, ρυθμιστικό διάλυμα) με έντονες συνθήκες ξήρανσης δίνει ανάκτηση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση.



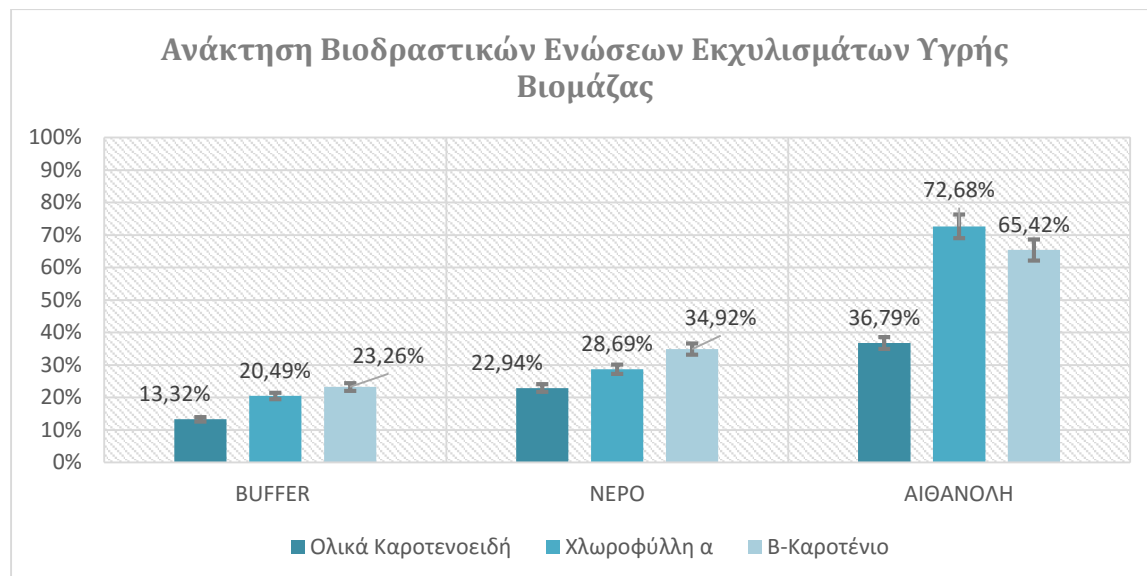
Διάγραμμα 31. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet της υγρής, λυοφιλιωμένης και επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Τα pellet έχουν χαμηλότερη απόδοση στα αντιοξειδωτικά λόγω της αποτελεσματικής εκχύλισης και της ανάκτησης των ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση, οι οποίες βρίσκονταν στο εκχυλίσσιμο κλάσμα της βιομάζας.

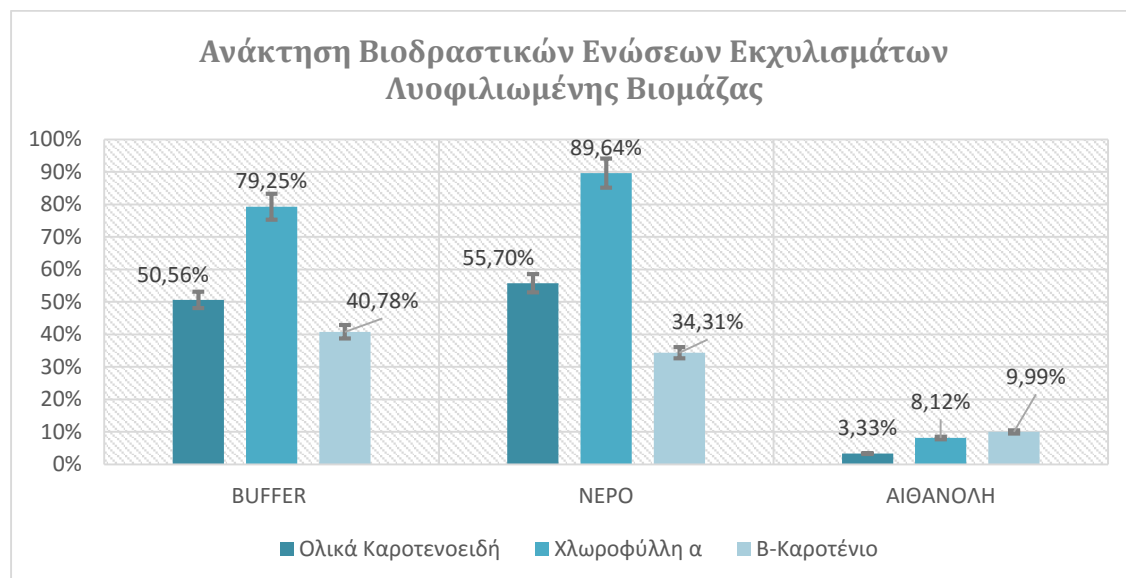
Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να εκτιμηθεί και από τον αποχρωματισμό του διαλύματος DPPH•. Τα εκχυλίσματα του ρυθμιστικού διαλύματος και του νερού έδειξαν μεγαλύτερη μεταβολή στο χρώμα.

9.3.2.5. Ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων

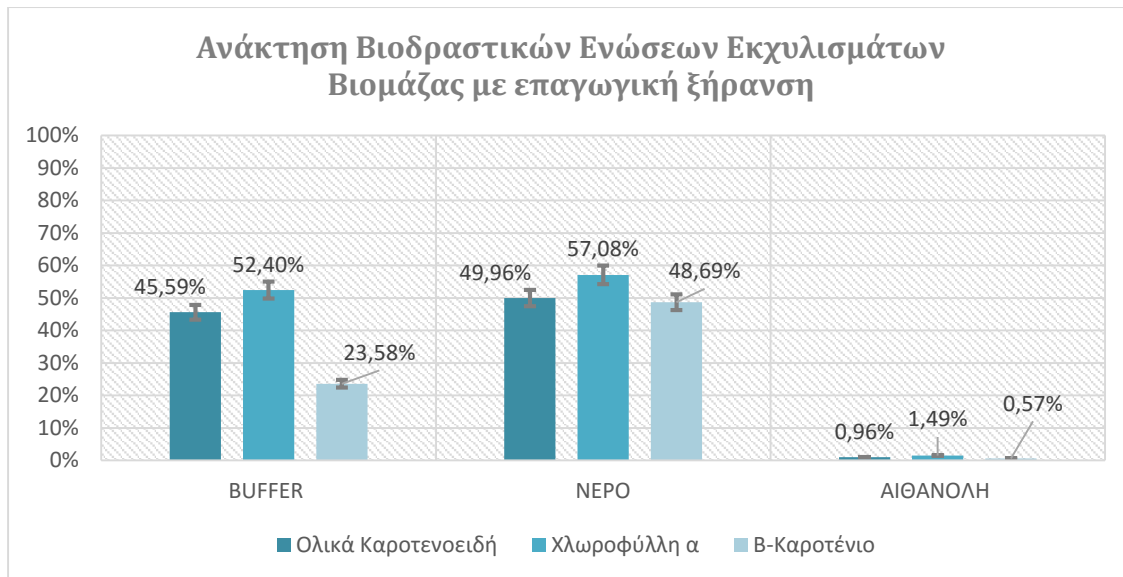
Η ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων από τους τρεις διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε είδος βιομάζας εμφανίζονται στα επόμενα Διαγράμματα 32,33 και 34.



Διάγραμμα 32. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της υγρής *Chlorella Vulgaris*



Διάγραμμα 33. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της λυοφιλιωμένης *Chlorella Vulgaris*



Διάγραμμα 34. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων της επαγωγικής *Chlorella Vulgaris*

Όπως περιγράφηκε αναλυτικά προηγουμένως, ο βέλτιστος διαλύτης της υγρής *Chlorella Vulgaris* είναι η αιθανόλη. Στην ξηρή βιομάζα καλύτερος διαλύτης αποδεικνύεται το νερό, με μικρή διαφορά από το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο, όμως, έχει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Νερό και ρυθμιστικό διάλυμα buffer, πάντως μπορούν να θεωρηθούν οι βέλτιστοι διαλύτες της ξηρής βιομάζας. Από την άλλη, η αιθανόλη δεν θεωρείται αποτελεσματική σε αυτήν την περίπτωση.

9.4. Συμπεράσματα

- Η *Chlorella Vulgaris* είναι ένα μικροφύκος πλούσιο σε ολικά καροτενοειδή, ενώ το περιεχόμενό της σε χλωροφύλλες είναι περιορισμένο,
- Καλύτερη μέθοδος ξήρανσης για την *Chlorella Vulgaris*, ανάμεσα στην λυοφιλίωση και στην επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα, είναι η πρώτη, που περιορίζει πολύ την υγρασία (0,88% υγρασία στην λυοφιλιωμένη έναντι 70,39% υγρασία στην νωπή) και διατηρεί το θρεπτικό και βιοδραστικό περιεχόμενο.
- Αν στόχος είναι η ανάκτηση όσο το δυνατό περισσότερων ολικών καροτενοειδών, χλωροφυλλών και β-καροτενίου, τότε δεν χρειάζεται να πραγματοποιηθεί ξήρανση και βέλτιστος διαλύτης για την εκχύλισή της είναι η αιθανόλη.
- Αντίστοιχα για την ξηρή βιομάζα, της οποίας το περιεχόμενο σε βιοδραστικές ενώσεις είναι πιο υποβαμισμένο από της νωπής, βέλτιστοι διαλύτες είναι το νερό και το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).
- Αν στόχος είναι η παρασκευή διαλυμάτων με πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, τότε βέλτιστο είδος ξήρανσης αποτελεί η επαγωγική ξήρανση θερμού ρεύματος αέρα και βέλτιστος διαλύτης είναι το ρυθμιστικό διάλυμα και στην συνέχεια το νερό.

- Τα υπολείμματα των εκχυλίσεων φάνηκε να έχουν κάποιο βιοδραστικό περιεχόμενο (όχι τόσο σημαντικό όσο τα εκχυλίσματα), καθιστώντας δυνατή την αξιοποίησή τους σε εφαρμογές, όπως οι ιχθυοκαλλιέργειες, εφόσον και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατάλληλοι.

Κεφάλαιο 10. *Haematococcus Pluvialis*

10.1. Υλικά

Το μικροφύκος παραλήφθηκε σε ξηρή μορφή με υγρασία $2,99 \pm 0,15\%$ από την εταιρία AlgaTechnologies, που εδρεύει στο Ισραήλ, αφού νωρίτερα είχε αναπτυχθεί υπό συνθήκες στρες, ώστε να συσσωρευτεί σημαντική ποσότητα ασταξανθίνης. Το χρώμα της ξηρής βιομάζας ήταν σκούρο κόκκινο και η μορφή της ήταν νιφάδες με μικρή διάμετρο. Η ακετόνη που χρησιμοποιήθηκε στις εκχυλίσεις και στον προσδιορισμό του βιοδραστικού περιεχομένου ήταν αναλυτικής καθαρότητας και παραλήφθηκε από την εταιρία Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο). Οι υπόλοιποι διαλύτες: λεμονένιο, σογιέλαιο και, μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια (medium chain triglycerides, MCT) ήταν σε καθαρότητα ικανή να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα και παραλήφθηκαν από την εταιρία ASPIS SA που εδρεύει στο Άργος. Η ρίζα 2,2-διφαινυλο-πικρυλ υδραζύλιο (DPPH) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich.

10.2. Μέθοδοι

10.2.1. Εκχύλιση

Τα δείγματα του μικροφύκου *Haematococcus Pluvialis* εκχυλίστηκαν με την μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας τέσσερις διαλύτες: ακετόνη, λεμονένιο, μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια (medium chain triglycerides, MCT) και σογιέλαιο. Οι εκχυλίσεις με υπέρηχους διεξήχθησαν στο λουτρό υπερήχων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China). Τα δείγματα (ξηρό βάρος: 2,5 γραμμάρια) τοποθετούνταν στο δοχείο εκχύλισης (beaker) μαζί με τον διαλύτη (50 ml), με αναλογία στερού/διαλύτη: 1 γραμμάριο ξηρής βιομάζας /20 ανά ml διαλύτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε συχνότητα 25 kHz, στα 450 Watt και σε θερμοκρασία 30 °C και διαρκούσαν 5 min.

Περίληπτικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, οι συνθήκες εκχύλισης, καθώς και οι βιοδραστικές ενώσεις, των οποίων το περιεχόμενο αξιολογήθηκε, παρουσιάζονται για το μικροφύκος *Haematococcus Pluvialis* στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος *Haematococcus Pluvialis* (HP)

Μικροφύκος	Διαλύτες	Συνθήκες Εκχύλισης	Βιοδραστικές Ουσίες
Haematococcus Pluvialis (HP)	Ακετόνη Λεμονένιο MCT έλαιο σογιέλαιο	25 kHz 50 ml διαλύτη Ξηρό Βάρος HP: 2,5 g 450 W 50%P t=5 min	Ολικά Καροτενοειδή Χλωροφύλλες Ασταξανθίνη

Η απόδοση της εκχύλισης εκφράστηκε ως ποσοστό του ξηρού βάρους του εκχυλίσματος που αποκτήθηκε προς το ξηρό βάρος του δείγματος πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Απόδοση Εκχύλισης % = (Ξηρό Βάρος Εκχυλίσματος / Ξηρό Βάρος Δείγματος) * 100%

10.2.2. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου

10.2.2.1. Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών

Το περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες εκτιμήθηκε μέσω του τροποποιημένου πρωτοκόλλου Jeffrey (Jeffrey et al. 1997), ώστε να συμπεριλαμβάνεται και η απορρόφηση της ασταξανθίνης, που αποτελεί το κύριο καροτενοειδές του αιματόκοκκου.

Συγκεκριμένα, 50 mg στερεού δείγματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου, όπου προστίθενται 5 ml ακετόνης 90%. Το δείγμα ομογενοποιείται στο vortex και αφήνεται για 24 ώρες στους -18°C. Ύστερα, ομογενοποιείται ξανά στο vortex και φυγοκεντρείται για 10 min στις 3000 στροφές, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινη κυψελίδα φωτομέτρου και μετράται η απορρόφησή του. Πριν από κάθε δείγμα, μετράται η απορρόφηση της ακετόνης 90% που χρησιμοποιείται ως τυφλό. Τα μήκη κύματος που ενδιαφέρουν είναι:

- 750 nm: γίνεται έλεγχος αν η απορρόφηση είναι μηδενική
- 664, 647, 630 nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες
- 510, 480, 475 nm: μήκη κύματος που απορροφούν τα καροτενοειδή

Στην συνέχεια, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας με την χρήση των παρακάτω εξισώσεων:

$$Ca \text{ (}\mu\text{g/L)} = 11,85(A_{664}) - 1,54(A_{647}) - 0,08(A_{630}) \quad \text{Εξ. 1}$$

$$Cb \text{ (}\mu\text{g/L)} = 21,03(A_{647}) - 5,43(A_{664}) - 2,66(A_{630}) \quad \text{Εξ. 2}$$

$$Cc \text{ (}\mu\text{g/L)} = 24,52(A_{630}) - 1,67(A_{664}) - 7,60(A_{647}) \quad \text{Εξ. 3}$$

$$Cr \text{ (}\mu\text{g/L)} = 7,35(A_{475}) + 7,60(A_{480}) - 1,49(A_{510}) \quad \text{Εξ. 4}$$

Η εξίσωση 1 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης Α, η Εξίσωση 2 για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης Β, η Εξίσωση 3 για τον υπολογισμό της χλωροφύλλης Γ, ενώ η Εξίσωση 4 για τον υπολογισμό των ολικών καροτενοειδών.

10.2.2.2. Προσδιορισμός Ασταξανθίνης

Το περιεχόμενο σε ασταξανθίνη εκτιμήθηκε μέσω του τροποποιημένου πρωτοκόλλου των Ben Amotz & Avron 1983 (Ben-Amotz & Avron 1983).

Πιο αναλυτικά, 50 mg στερεού δείγματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα φυγόκεντρου, όπου προστίθενται 5 ml ακετόνης 80%. Το δείγμα ομογενοποιείται στο vortex και συντηρείται στο ψυγείο κατά την διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, ομογενοποιείται ξανά στο vortex και φυγοκεντρείται για

25 min στις 2500 στροφές, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινη κυψελίδα φωτομέτρου και μετράται η απορρόφησή του στα 475 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται η ακετόνη 80%. Η συγκέντρωση της ασταξανθίνης υπολογίζεται από τον νόμο του Beer, εξίσωση 5.

$$C = A/\epsilon l \text{ (mol/l)} \quad \text{Εξ.5}$$

Όπου: A: απορρόφηση στα 475 nm

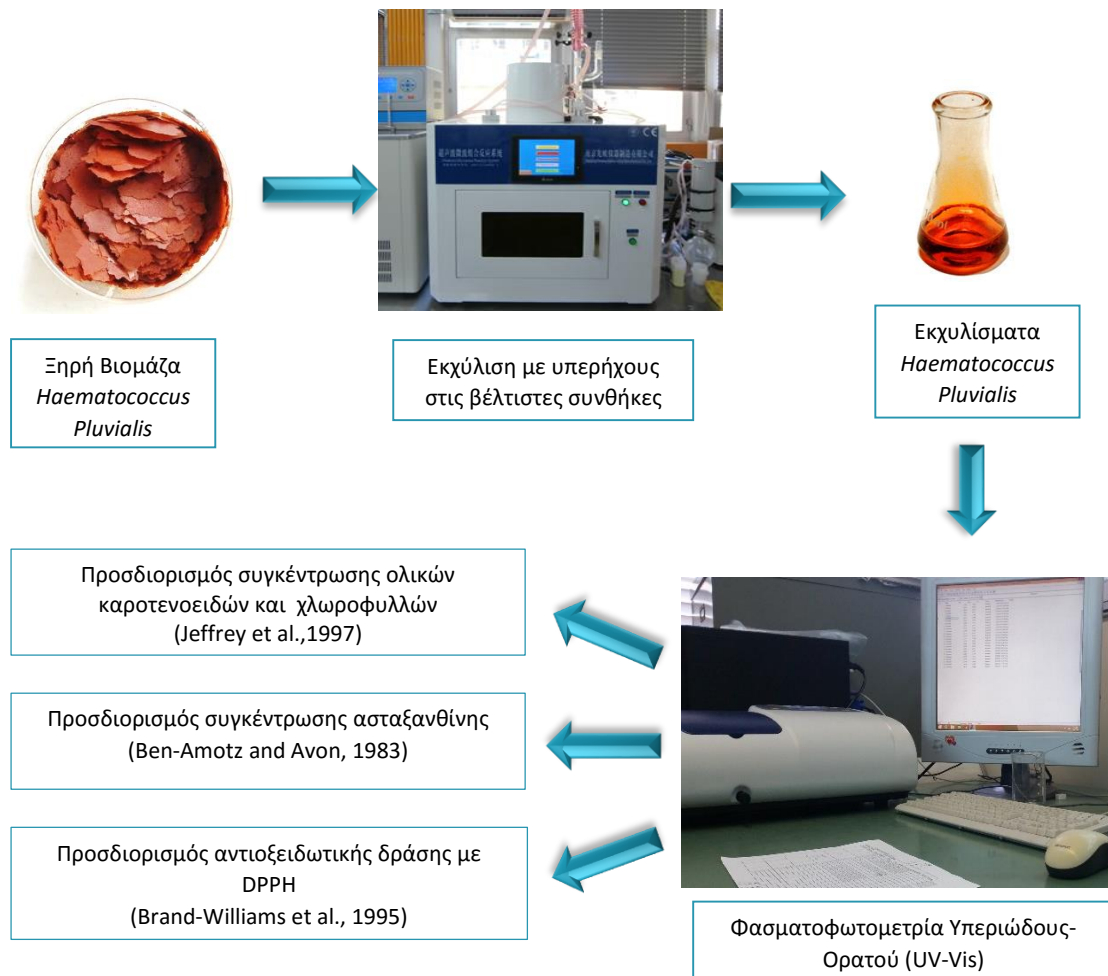
ϵ : συντελεστής απόσβεσης / $\epsilon = 2198$ για τα 475 nm για την ασταξανθίνη

l: η απόσταση που διανύει η δέσμη φωτός (1 cm)

10.2.2.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης με DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας 2,2- διφαινυλο- 1- πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH•)(Brand-Williams et al. 1995). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.4.

Περίληπτικά, το διάγραμμα ροής των διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν στην ξηρή βιομάζα του *Haematococcus Pluvialis* εμφανίζεται παρακάτω.



Σχήμα 4. Διάγραμμα Ροής Διεργασιών που ακολουθήθηκαν κατά την επεξεργασία της βιομάζας του *Haematococcus Pluvialis*

10.3. Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

10.3.1. Επίδραση του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο

Η εκχύλιση 2,5 gr ξηρού βάρους *Haematococcus Pluvialis* με 50 ml των διαλυτών έδωσε τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 19.

Επειδή το μικροφύκος *Haematococcus Pluvialis* βιοσυνθέτει πολλά καροτενοειδή, ιδιαίτερα ασταξανθίνη, που μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (1,5-3% του βάρους) και γνωρίζοντας ότι τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές ενώσεις, επιλέχθηκαν διαλύτες που μπορούν να αποσπάσουν αυτό το λιπόφιλο κλάσμα (Denery et al. 2004). Η ακετόνη χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης αναφοράς, καθώς ανακτά το λιπόφιλο κλάσμα, αφού είναι μη πολικός διαλύτης. Επειδή, όμως, δεν είναι βρώσιμη, έγινε προσπάθεια να αντικατασταθεί με αντίστοιχα έλαια, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα τροφίμων, όπως το MCT έλαιο και το αιθέριο έλαιο του λεμονένιου. Ενώ επιλέχθηκε επίσης το σογιέλαιο λόγω της χαμηλής εμπορικής του αξίας και της ευρείας χρήσης του σε προϊόντα τροφίμων.

Το λεμονένιο επιλέχθηκε γιατί είναι ένα γεωργικό παραπροϊόν από την βιομηχανία εσπεριδοειδών και έχει χρησιμοποιηθεί και εφαρμοστεί με επιτυχία για δεκαετίες, χάρη στην γεύση, το άρωμα και την συμβατότητά του με τα τρόφιμα. Βάσει πρόσφατων δημοσιεύσεων, φαίνεται ότι μπορεί να αντικαταστήσει ικανοποιητικά το εξάνιο ως διαλύτης, απαιτώντας όμως υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας για την ανάκτησή του (Chemat-Djenni et al. 2010; Virost et al. 2008). Το MCT αποτελεί το 75% της παραγωγής των γαλακτωματοποιητών τροφίμων. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν αυτόνομες δομές, όπως είναι η φάση υγρών κρυστάλλων, όταν έρχονται σε επαφή με το νερό. Αυτές οι φάσεις υγρών κρυστάλλων, όταν διασπαρούν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα δέσμευσης των χρωστικών και των διαφόρων βιοδραστικών συστατικών κατά την εκχύλιση των μικροφυκών, εκχυλίζοντας έτσι και το λιπόφιλο και το υδρόφιλο κλάσμα (Amar-Yuli et al. 2008; Amar-yuli et al. 2009).

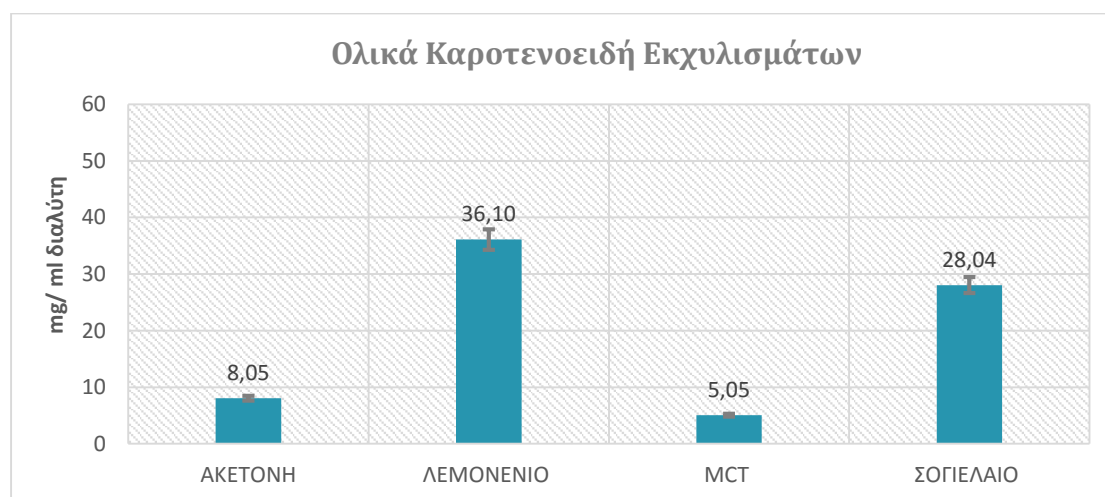
Πίνακας 19. Αποτελέσματα εκχύλισης της ξηρής βιομάζας *Haematococcus Pluvialis* με τους διαλύτες ακετόνη, MCT, λεμονένιο και σογιέλαιο

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ			PELLET	
	ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ml)	ΞΗΡΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ %	PELLET (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ %
ΑΚΕΤΟΝΗ	43,20	0,70	28,66	0,65	26,58
MCT	42,20	-	-	-	-
ΛΕΜΟΝΕΝΙΟ	45,70	-	-	1,63	67,16
ΣΟΓΙΕΛΑΙΟ	42,10	-	-	-	-

Ο καλύτερος διαλύτης, όσον αφορά την ανάκτηση ξηρών εκχυλισμάτων είναι η ακετόνη, καθώς απομακρύνεται πλήρως, αφήνοντας ένα ξηρό εκχύλισμα. Παρόλα αυτά, η ακετόνη δεν είναι βρώσιμη, όποτε η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί σε διαλύτες που μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων, χωρίς περαιτέρω διαδικασίες απομάκρυνσης και εξευγενισμού. Για τον παραπάνω λόγο επιλέχθηκαν το MCT, το λεμονένιο και το σογιέλαιο. Η απόδοση των ξηρών εκχυλισμάτων για αυτούς τους διαλύτες, όμως, δεν μπορεί να υπολογιστεί καθώς η πλήρης απομάκρυνσή τους από τα εκχυλίσματα και τα υπολείμματα των εκχυλίσεων είναι αδύνατη (το λεμονένιο, μόνο μπορεί να εξατμιστεί από το πέλετ της εκχύλισης). Παρόλα αυτά, θα πραγματοποιηθεί ποιοτική αξιολόγηση βάσει των πρωτοκόλλων που αναφέρονται στην παράγραφο 10.2.2.

10.3.1.1. Ολικά Καροτενοειδή

Η μέτρηση των ολικών καροτενοειδών έγινε φασματοφωτομετρικά στα 510, 480 και 475 nm. Τα αποτελέσματα για τα εκχυλίσματα, φαίνονται στο Διάγραμμα 35, ενώ για τα πέλετ στο Διάγραμμα 36.



Διάγραμμα 35. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών των Εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*

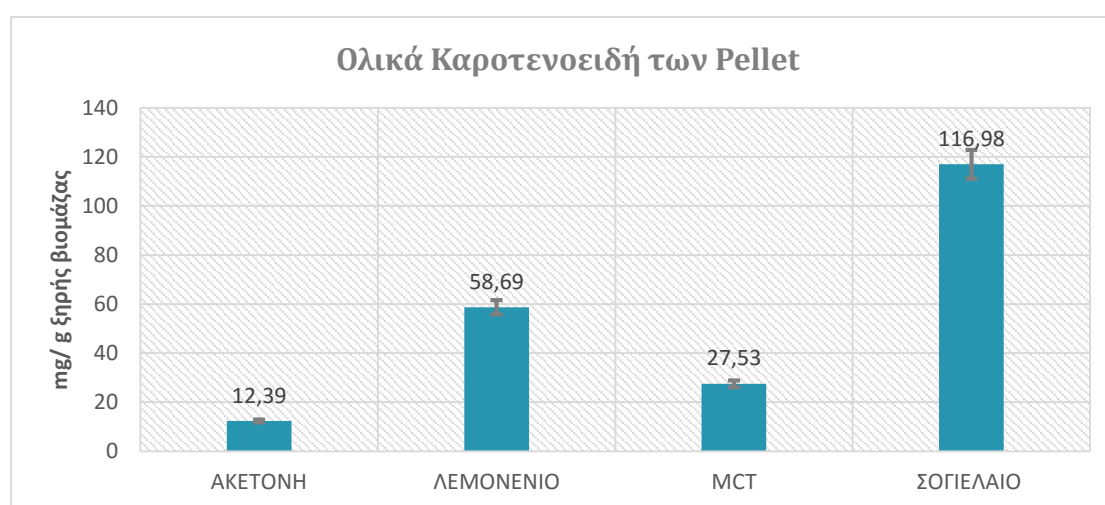
Η ακετόνη έδειξε να έχει πολύ καλή ανάκτηση ολικών καροτενοειδών. Το ότι η ακετόνη έχει πολύ καλές αποδόσεις στα ολικά καροτενοειδή επιβεβαιώνεται και από τον J.R.Denary, όταν συγκρίνει την ακετόνη με την αιθανόλη, ως διαλύτες εκχύλισης (Denery et al. 2004). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και ο D. Ruen-ngam, όταν η ακετόνη χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του *Haematococcus Pluvialis* παρουσία υπερήχων και είχε την μεγαλύτερη ανάκτηση ασταξανθίνης (70% ανάκτηση), συγκρινόμενη με μεθανόλη, αιθανόλη και ακετονιτρίλιο (περίπου 30%, 20% και 15% ανάκτηση αντίστοιχα) (Ruen-ngam et al. 2011).

Ελαφρώς χειρότερες τιμές είχε το MCT, όπου η ανάκτηση ολικών καροτενοειδών και ασταξανθίνης είναι χειρότερη, χωρίς όμως το MCT να αποκλείεται ως βρώσιμος διαλύτης για εφαρμογή σε συστήματα τροφίμων. Από την άλλη πλευρά, το σογιέλαιο και λεμονένιο έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ολικά καροτενοειδή από ότι η

ακετόνη. Αυτό οφείλεται στην φύση των δύο διαλυτών. Συγκεκριμένα, το λεμονένιο σαν αιθέριο έλαιο παρουσιάζει μερική αναμιξιμότητα με το νερό και για αυτό εμφανίζεται νέφωμα στην κιβέτα μέτρησης, αντίθετα με το σογιέλαιο και το MCT, όπου υπάρχει διαχωρισμός υδατικής και λιπαρής φάσης. Ωστόσο, το σογιέλαιο από μόνο του έχει ένα χαρακτηριστικό χρυσαφί χρώμα, το οποίο δείχνει να απορροφά κοντά στο εύρος απορρόφησης των καροτενοειδών, δημιουργώντας φαινόμενα επικάλυψης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 20. Το σογιέλαιο και άλλα έλαια φυτικής προέλευσης χρησιμοποιούνται πολύ συχνά σαν συν-διαλύτες σε υπερκρίσιμες εκχυλίσεις (Wang et al. 2012; Krichnavaruk et al. 2008) γιατί η παρουσία τους είναι ωφέλιμη. Αυτό οφείλεται στην υψηλότερη διαλυτότητα της ασταξανθίνης στο μίγμα σογιελαιού και υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (SC-CO₂), αλλά και στον γρηγορότερο ρυθμό μεταφοράς μάζας της ασταξανθίνης μέσω της διογκωμένης μήτρας, που προκαλείται από το μίγμα διαλυτών (Krichnavaruk et al. 2008).

Πίνακας 20. Απορρόφηση των καθαρών διαλυτών στα μήκη κύματος 750, 664, 647, 630, 510 και 480 nm

Διαλύτες	A ₇₅₀	A ₆₆₄	A ₆₄₇	A ₆₃₀	A ₅₁₀	A ₄₈₀
Λεμονένιο	1,1976	1,1230	1,1048	1,0985	1,0441	1,0499
MCT	0,5988	0,5105	0,4603	0,4447	0,3600	0,3750
Σογιέλαιο	1,0064	1,0034	1,0263	1,0208	0,9297	0,9029

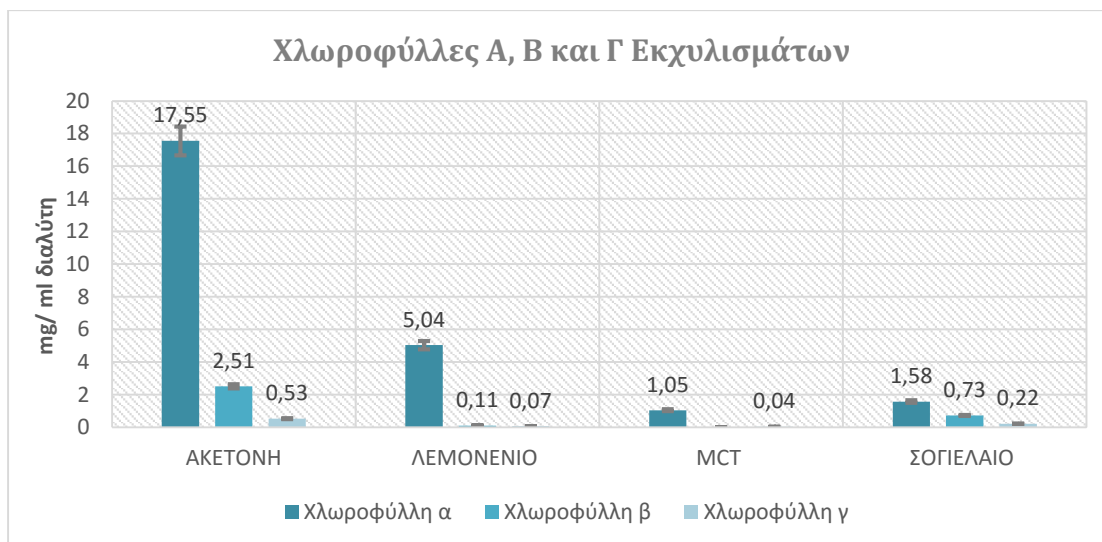


Διάγραμμα 36. Συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών των pellet του *Haematococcus Pluvialis*

Παρόμοια τάση παρουσιάζουν τα ολικά καροτενοειδή και στα πέλετ. Η ακετόνη σαν αποτελεσματικός διαλύτης κατάφερνει να αποσπάσει τα περισσότερα καροτενοειδή και τα πέλετ της έχουν την μικρότερη συγκέντρωση. Ακολουθεί το MCT, το λεμονένιο και τέλος το σογιέλαιο. Πρέπει, βέβαια, να ληφθεί υπόψη ότι τα πέλετ αυτά δεν ήταν ξηρή βιομάζα, αλλά μια ανάμιξή τους με τα αντίστοιχα έλαια. Ο διαχωρισμός τους θεωρείται ασύμφορος και δεν ήταν εφικτός στα πλαίσια της Διπλωματικής Εργασίας.

10.3.1.2. Χλωροφύλλες

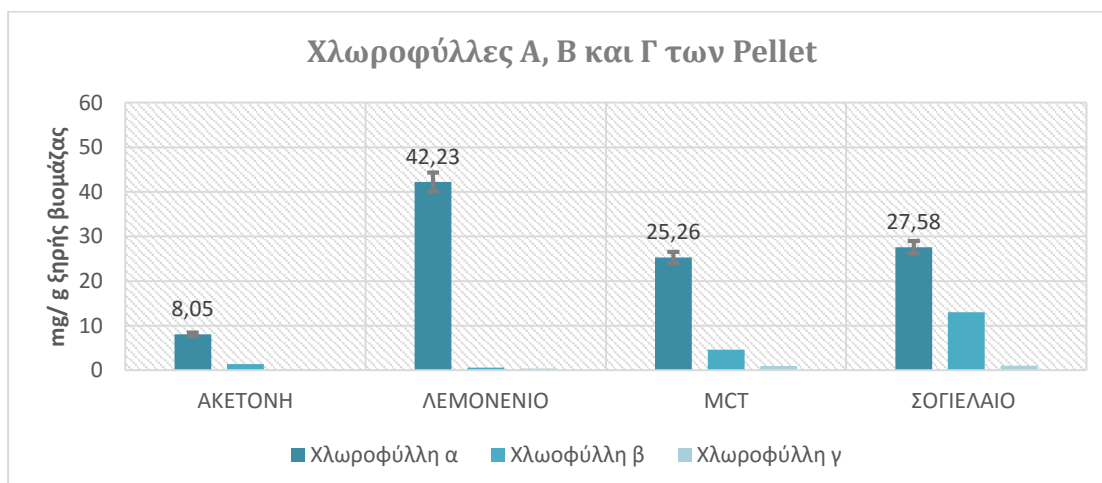
Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών α, β και γ που μετρήθηκε για τα εκχυλίσματα των τεσσάρων διαλυτών, εμφανίζεται στο Διάγραμμα 37.



Διάγραμμα 37. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*

Ο Αιματόκοκκος ανήκει στα Χλωρόφυτα και περιέχει χλωροφύλλες, αλλά για να παράξει ασταξανθίνη στρεσάρεται και καταναλώνει μεγάλο ποσοστό των χλωροφυλλών. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν έδειξαν να έχουν χλωροφύλλες, κυρίως α, έστω και σε μικρό ποσοστό, με την ακετόνη να δείχνει το μεγαλύτερο κλάσμα ανάκτησης. Ακολουθούν το λεμονένιο, το σογιέλαιο και το ΜCΤ.

Η αντίστοιχη συγκέντρωση για τα πέλετ παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 38.



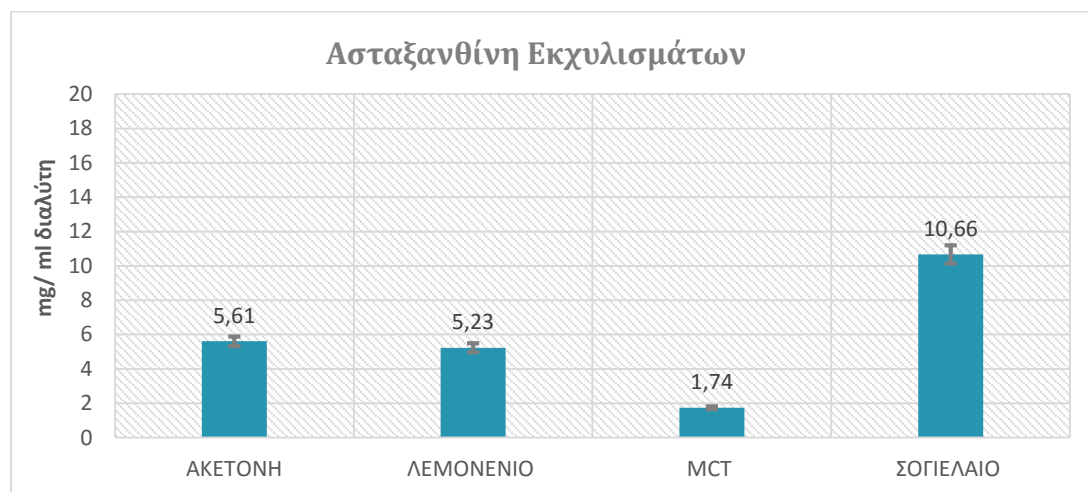
Διάγραμμα 38. Συγκέντρωση των χλωροφυλλών α, β και γ των pellet του *Haematococcus Pluvialis*

Αντίστοιχο προφίλ εναπομείνσων χλωροφυλλών παρουσιάζουν και τα πέλετ. Το υψηλό ποσοστό των χλωροφυλλών στα πέλετ οφείλεται στην απομάκρυνση των υπόλοιπων εκχυλίσμων συστατικών της βιομάζας.

Τέλος, το λεμονένιο φαίνεται να είναι πιο εκλεκτικό με τις χλωροφύλλες, στα εκχυλίσματα και τα πέλετ. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην φύση του διαλύτη αυτού που δείχνει να ανακτά τόσο λιπόφιλες, όσο και υδρόφιλες χρωστικές.

10.3.1.3. Ασταξανθίνη

Η ασταξανθίνη είναι το κυριότερο καροτενοειδές του *Haematococcus Pluvialis* και σε πολύ συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, μπορεί να φτάσει το ποσοστό του 88% των ολικών καροτενοειδών (Sarada et al. 2006; Kang & Sim 2008). Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης των εκχυλισμάτων στα 475 nm και του υπολογισμού του περιεχομένου τους σε ασταξανθίνη βρίσκονται στο Διάγραμμα 39.



Διάγραμμα 39. Συγκέντρωση ασταξανθίνης των Εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*

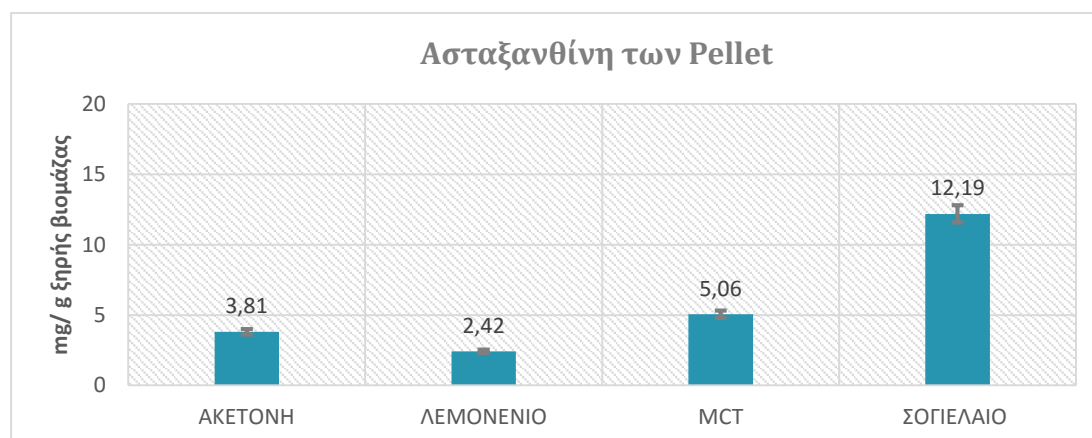
Το προφίλ της ασταξανθίνης είναι παρόμοιο με τα ολικά καροτενοειδή, το περιεχόμενο των οποίων στα εκχυλίσματα των διάφορων διαλυτών αναλύθηκε παραπάνω. Η μόνη εξαίρεση είναι το λεμονένιο, το οποίο παρουσιάζει συγκεντρώσεις ασταξανθίνης πολύ κοντά με την ακετόνη και όχι σε αναλογία με τα ολικά καροτενοειδή, πράγμα που σημαίνει ότι είναι λιγότερο εκλεκτικός διαλύτης ως προς το καροτενοειδές αυτό. Αυτό φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα, όπου παρουσιάζονται τα ποσοστά της ασταξανθίνης στα ολικά καροτενοειδή.

Πίνακας 21. Ποσοστό ασταξανθίνης στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΣΤΑΞΑΝΘΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΛΙΚΑ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ (%)
ΑΚΕΤΟΝΗ	69,71± 3,86%
ΛΕΜΟΝΕΝΙΟ	14,48± 0,72%
ΜCΤ	34,47±1,72%
ΣΟΓΙΕΛΛΑΙΟ	38,03±1,90%

Από τον Πίνακα 21, φαίνεται ότι το εκχύλισμα της ακετόνης παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό ασταξανθίνης, για αυτό και βιβλιογραφικά η ακετόνη προτείνεται ως ο συνηθέστερος διαλύτης για την ανάκτησή της (Denery et al. 2004; Ruen-ngam et al. 2011).

Η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στα πέλετ εμφανίζεται στο Διάγραμμα 40.

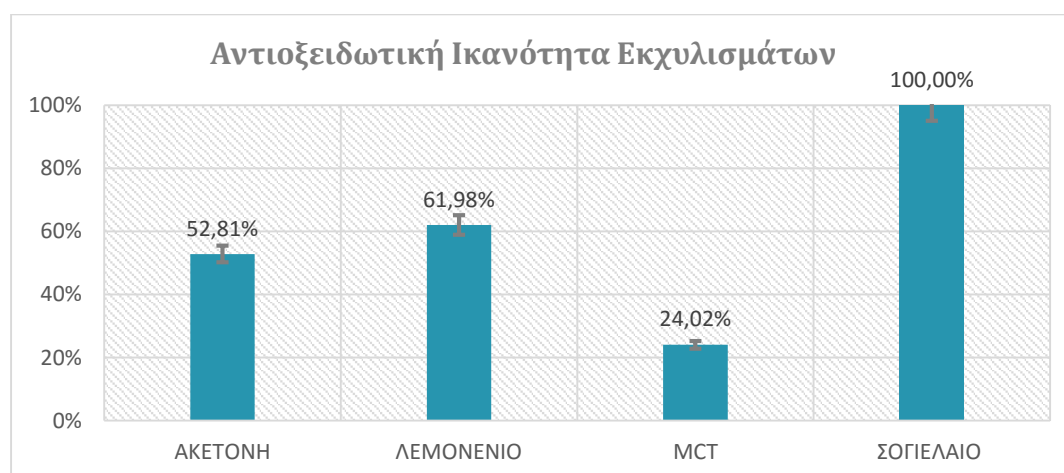


Διάγραμμα 40. Συγκέντρωση ασταξανθίνης των pellet του *Haematococcus Pluvialis*

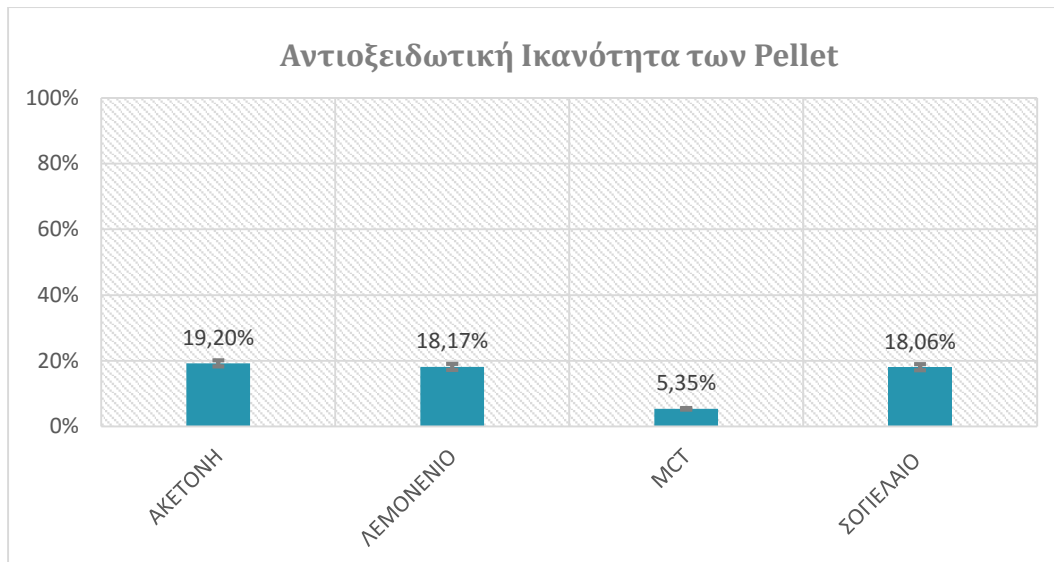
Τα πέλετ των εκχυλίσεων παρουσιάζουν επίσης υψηλό περιεχόμενο σε ασταξανθίνη, πράγμα που σημαίνει ότι η εκχύλιση δεν είναι πλήρης, παρότι το εκχύλισμα είναι πολύ πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά. Τα πέλετ αυτά μπορούν να έχουν εμπορική αξία, λόγω του θρεπτικού τους περιεχομένου.

10.3.1.4. Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Η αντιοξειδωτική ικανότητα για τα διάφορα εκχυλίσματα και πέλετ παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 41 και 42.



Διάγραμμα 41. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*



Διάγραμμα 42. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet του *Haematococcus Pluvialis*

Πρώτη παρατήρηση που μπορεί να εξαχθεί από τα δύο Διαγράμματα είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των πέλετ. Αυτό παρατηρήθηκε και στα δύο προηγούμενα μικροφύκη (Σπιρουλίνα: διάγραμμα 15 και 16, Χλωρέλλα: διάγραμμα 30 και 31) και συνηγορεί στο ότι ανακτήθηκαν εκχυλίσματα πλούσιο βιοδραστικό περιεχόμενο. Παρόλα αυτά, τα υπολείμματα εκχύλισης έχουν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση, κάτι που δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την περαιτέρω χρήση τους ως ζωοτροφές.

Επιπλέον, παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του Αιματόκοκκου φτάνει σε πολύ μεγάλες τιμές, ξεπερνώντας τα μικροφύκη Σπιρουλίνα και Χλωρέλλα. Ο λόγος για τον οποίον συμβαίνει αυτό, είναι το ότι ο Αιματόκοκκος είναι η πλουσιότερη πηγή του κέτο-καροτενοειδούς ασταξανθίνη, συγκριτικά με οποιοδήποτε άλλο μικροφύκος. Η ασταξανθίνη είναι το κυριότερο καροτενοειδές του και, μάλιστα, σε πολύ συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας και ενεργοβόρες συνθήκες εκχύλισης, όπως η ομογενοποίηση, μπορεί να φτάσει το ποσοστό του 88% των ολικών καροτενοειδών (Sarada et al. 2006; Kang & Sim 2008) Η ασταξανθίνη έχει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, δέκα φορές μεγαλύτερη από το β-καροτένιο και είναι 500 φορές πιο αποτελεσματική από την α-τοκοφερόλη (Ceron MC1, Garcia-Malea MC, Rivas J, Acien FG, Fernandez JM, Del Río E, Guerrero MG 2007)

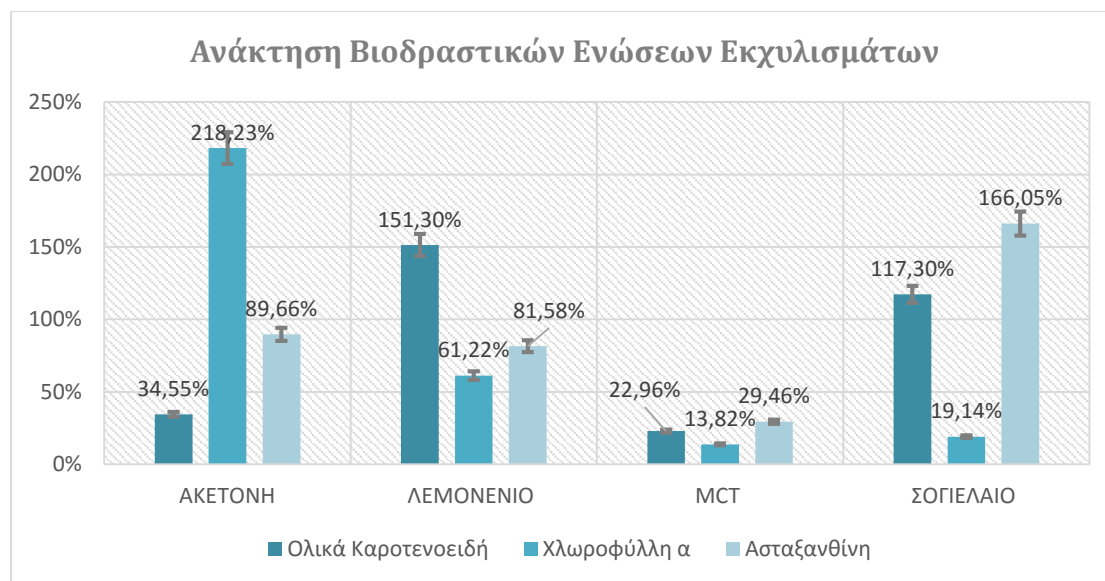
Συγκρίνοντας τους διάφορους διαλύτες μεταξύ τους, το σογιέλαιο έχει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, αγγίζοντας το 100%. Επειδή στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε σογιέλαιο του εμπορίου και τα έλαια εμπλουτίζονται με φυσικά αντιοξειδωτικά, που τα βοηθούν, ώστε να εμποδίζεται η οξειδωτική τάγγιση, είναι αναμενόμενο ότι θα παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση λόγω αυτού.

Ακολουθεί το εκχύλισμα του λεμονενίου, με αντιοξειδωτική δράση 61,98%. Το λεμονένιο, ως μονοτερπένιο, έχει φυσική αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, αυτό καθ'αυτό (Roberto et al. 2010; Junior et al. 2009), άρα κατ' αυτόν τον τρόπο εξηγείται και η μεγάλη αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματός του.

Τέλος, η ακετόνη, έδειξε να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ασταξανθίνης, που είναι πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία, και για αυτό το εκχυλισμά της παρουσιάζει καλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών.

10.3.1.5. Ανάκτηση των Βιοδραστικών Ενώσεων

Η ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων από τους τέσσερις διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ξηρή βιομάζα του *Haematococcus Pluvialis* εμφανίζεται στο Διάγραμμα 43.

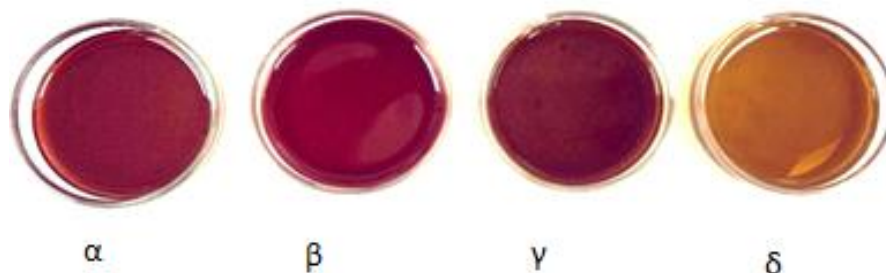


Διάγραμμα 43. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και της ασταξανθίνης των Εκχυλισμάτων του *Haematococcus Pluvialis*

Παρότι η ακετόνη έχει προταθεί βιβλιογραφικά για την ανάκτηση καροτενοειδών από μικροφύκη, στην περίπτωση του Αιματόκοκκου δείχνει να παρουσιάζει ένα ποσοστό ανάκτησης μικρότερο του 35%. Αντίστοιχα μικρό ποσοστό παρουσιάζει και το MCT που προτείνεται για την ανάκτηση κετο-καροτενοειδών, όπως η ασταξανθίνη. Ασυνήθιστα ποσοστά ανάκτησης παρουσιάζει το λεμονένιο και το σογιέλαιο, αλλά όπως εξηγήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, οι διαλύτες αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη απορρόφηση στο φάσμα μέτρησης, είτε λόγω νεφελώματος είτε της σύνθεσής τους που περιέχει ουσίες που απορροφούν σε αυτό το φάσμα.

Αντίστοιχα υψηλά ποσοστά ανάκτησης παρατηρούνται για τους συγκεκριμένους διαλύτες και στην περίπτωση της ασταξανθίνης, ενώ η ανάκτηση της χλωροφύλλης α παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Καθώς η βιοδραστική ένωση του Αιματόκοκκου που μας ενδιαφέρει είναι η ασταξανθίνη, παρατηρείται ότι ακετονικά εκχυλίσματα και εκχυλίσματα λεμονενίου παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ανάκτησης πάν από 80%, καθιστώντας αυτούς τους διαλύτες τους πλέον αποδοτικούς. Η υψηλή απόδοση του σογιέλαιου κρύβει μια υπερεκτίμηση στο περιεχόμενο της ασταξανθίνης, λόγω της φύσης του διαλύτη.

Ωστόσο από το παραπάνω διάγραμμα, αποδεικνύεται ότι λιγότερο αποτελεσματικός διαλύτης είναι το MCT. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί από το χρώμα των εκχυλισμάτων του, το οποίο δεν είναι τόσο έντονο σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα (Εικόνα 14)



Εικόνα 14. Εκχυλίσματα των διαλυτών: α. Λεμονενίου, β. Σογιέλαιου, γ. Ακετόνης, δ. MCT

10.4. Συμπεράσματα

- Ο Αιματόκοκκος είναι μια πλούσια πηγή ασταξανθίνης.
- Το ξηρό μικροφύκος που εκχυλίστηκε, έδειξε να έχει υψηλό βιοδραστικό περιεχόμενο, παρόλη την μερική καταπόνησή του λόγω προεπεξεργασίας (ξήρανση και λυοτρίβιση)
- Τόσο τα εκχυλίσματα, όσο και τα πέλετ αποδείχθηκε ότι έχουν υψηλό περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική δράση αυτή οφείλεται τόσο στην ασταξανθίνη, όσο και σε άλλους δευτερεύοντες μεταβολίτες που έχουν δημιουργηθεί κατά την ξήρανση.
- Τα πέλετ που έχουν προκύψει από την εκχύλιση φάνηκε να περιέχουν ακόμα βιοδραστικά συστατικά, κάνοντας πολύ ελκυστική την αξιοποίησή τους σε περαιτέρω εφαρμογές, όπως χρήση ως ζωοτροφές και στις υδατοκαλλιέργειες.
- Ο Αιματόκοκκος παρόλο που προέρχεται από συνθήκες καλλιέργειας για την παραγωγή ασταξανθίνης, έδειξε να περιέχει σημαντική ποσότητα χλωροφύλλης, η οποία δεν καταναλώθηκε ή καταστράφηκε κατά την προεπεξεργασία του.
- Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες τροφίμων και συγκεκριμένα, αυτά που ανακτήθηκαν με βρώσιμους διαλύτες, όπως το λεμονένιο, το MCT και το σογιέλαιο.
- Η χρήση βρώσιμων ελαίων ευνοεί την ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε συστήματα τροφίμων, ωστόσο τα έλαια δεν μπορούν να απομακρυνθούν από τα ανακτόμενα υπολείμματα, κάνοντας δύσκολη την χρήση τους σε εφαρμογές, όπως οι ιχθυοκαλλιέργειες. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το λεμονένιο, το οποίο ως αιθέριο έλαιο, εξατμίζεται σταδιακά, αφήνοντας ένα ξηρό πέλετ.

Κεφάλαιο 11. *Phaeodactylum Tricornutum*

11.1. Υλικά

Το μικροφύκος *Phaeodactylum Tricornutum* παραλήφθηκε σε ξηρή μορφή από την AlgaTechnologies, που εδρεύει στο Ισραήλ, αφού νωρίτερα είχε αναπτυχθεί υπό συνθήκες στρες, ώστε να συσσωρευτεί σημαντική ποσότητα λιπαρών οξέων και φουκοξανθίνης. Επίσης, είχε υποστεί προεπεξεργασία κατά την οποία είχε επιτευχθεί διάρρηξη των κυττάρων και διάχυση των εκχυλίσμων συστατικών στην μάζα του μικροφύκου. Το χρώμα της ξηρής βιομάζας ήταν καφέ και η μορφή της ήταν νιφάδες με μικρή διάμετρο. Το εξάνιο και η ακετόνη που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις και στον προσδιορισμό του βιοδραστικού περιεχομένου ήταν αναλυτικής καθαρότητας και παραλήφθηκαν από την εταιρία Fisher Scientific (Ηνωμένο Βασίλειο). Οι υπόλοιποι διαλύτες: λεμονένιο και, μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια (medium chain triglycerides, MCT) ήταν σε καθαρότητα ικανή να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα. Η ρίζα 2,2-διφαινυλο-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich.

11.2. Μέθοδοι

11.2.1. Εκχύλιση

Τα δείγματα του μικροφύκου εκχυλίστηκαν με την μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, χρησιμοποιώντας τέσσερις διαλύτες: νερό, μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια (medium chain triglycerides, MCT), εξάνιο και λεμονένιο. Οι εκχυλίσεις με υπέρηχους διεξήχθησαν στο λουτρό υπερήχων XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China). Τα δείγματα (ξηρό βάρος: 2,5 γραμμάρια) τοποθετούνταν στο δοχείο εκχύλισης (beaker) μαζί με τον διαλύτη (50 ml), με αναλογία στερού/διαλύτη: 1 γραμμάριο ξηρής βιομάζας /20 ανά ml διαλύτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν σε συχνότητα 25 kHz, στα 450 Watt και σε θερμοκρασία 20 °C και διαρκούσαν 5 min.

Περίληπτικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, οι συνθήκες εκχύλισης, καθώς και οι βιοδραστικές ενώσεις, των οποίων το περιεχόμενο αξιολογήθηκε, παρουσιάζονται για το μικροφύκος *Phaeodactylum Tricornutum* στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22. Σχεδιασμός Εκχυλίσεων για το μικροφύκος *Phaeodactylum Tricornutum* (PT)

Μικροφύκος	Διαλύτες	Συνθήκες Εκχύλισης	Βιοδραστικές Ουσίες
Phaeodactylum Tricornutum (PT)	Νερό MCT Εξάνιο Λεμονένιο	25 kHz 50 ml διαλύτη Ξηρό Βάρος PT: 2,5 g 450 W 50%P t=5 min	Ολικά Καροτενοειδή Χλωροφύλλες Β-καροτένιο

Η απόδοση της εκχύλισης εκφράστηκε ως ποσοστό του ξηρού βάρους του εκχυλίσματος που αποκτήθηκε προς το ξηρό βάρος του δείγματος πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Απόδοση Εκχύλισης % = (Ξηρό Βάρος Εκχυλίσματος / Ξηρό Βάρος Δείγματος) * 100%

11.2.2. Προσδιορισμός Βιοδραστικού Περιεχομένου

11.2.2.1. Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών και χλωροφυλλών

Το περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου Jeffrey (Jeffrey et al. 1997), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.1.

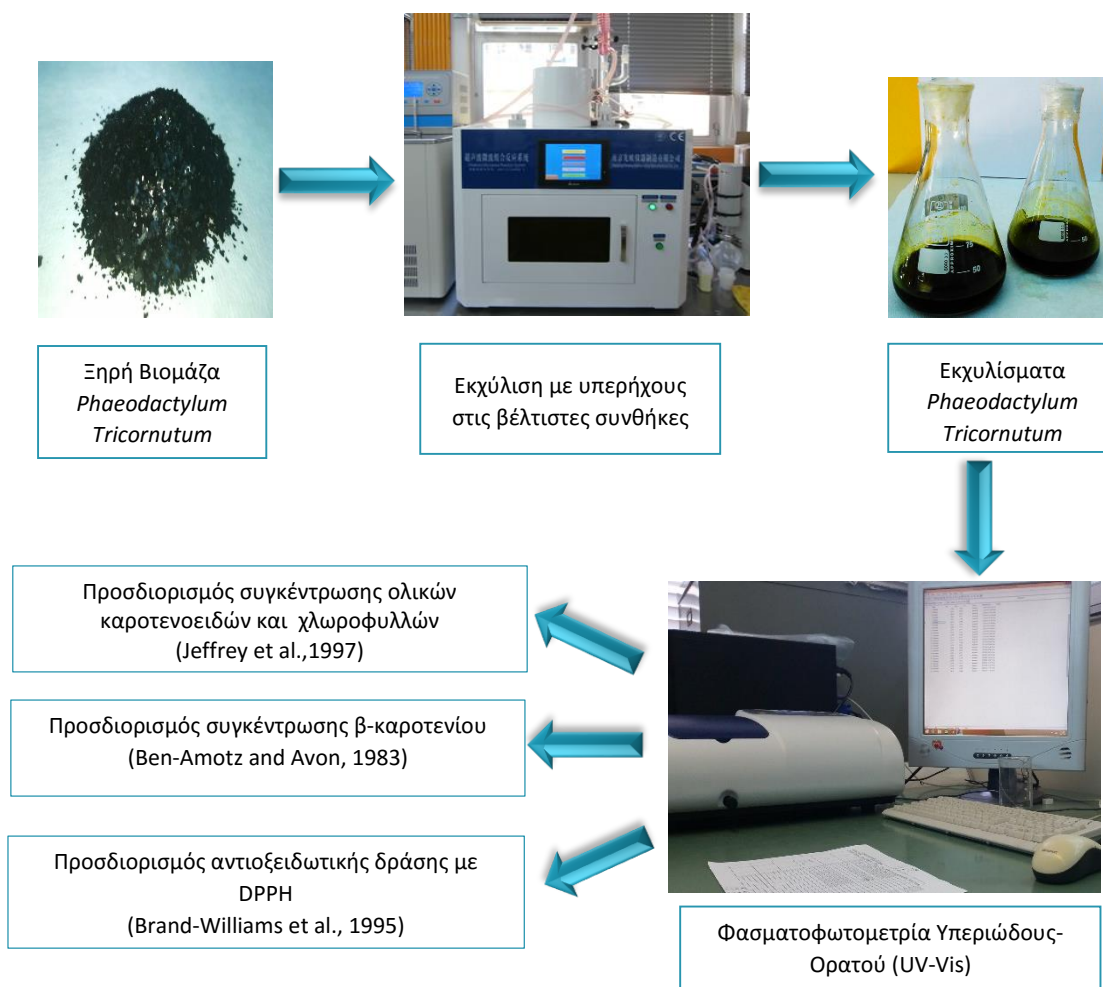
11.2.2.2. Προσδιορισμός β-καροτενίου

Το περιεχόμενο σε β-καροτένιο εκτιμήθηκε μέσω του πρωτοκόλλου των Ben Amotz & Avron 1983 (Ben-Amotz & Avron 1983), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.2.

11.2.2.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης με Dpph

Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH•) (Brand-Williams et al. 1995). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε στην Ενότητα 8.2.3.4.

Περίληπτικά, το διάγραμμα ροής των διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν στην ξηρή βιομάζα του *Phaeodactylum Tricornutum* εμφανίζεται παρακάτω.



Σχήμα 5. Διάγραμμα Ροής Διεργασιών που ακολουθήθηκαν κατά την επεξεργασία της βιομάζας του *Phaeodactylum Tricornutum*

11.3.Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

11.3.1. Επίδραση του συστήματος διαλυτών στην απόδοση και στο βιοδραστικό περιεχόμενο

Η εκχύλιση 2,5 gr ξηρού βάρους *Phaeodactylum Tricornutum* με 50 ml των διαλυτών έδωσε τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 23.

Οι κυριότεροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση του *Phaeodactylum Tricornutum* είναι το νερό και το εξάνιο, ακολούθως η αιθανόλη και η μεθανόλη (Kim et al. 2012; González et al. 1998). Το λεμονένιο και το MCT επιλέχθηκαν για τους λόγους που εξηγήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

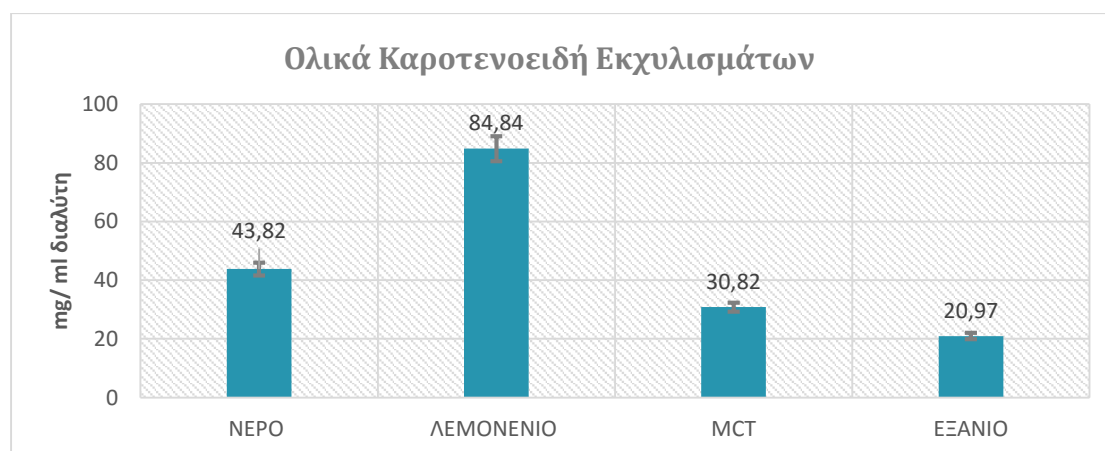
Πίνακας 23. Αποτελέσματα εκχύλισης της ξηρής βιομάζας *Phaeodactylum Tricornutum* με τους διαλύτες: νερό, MCT, εξάνιο και λεμονένιο

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ			PELLET	
	ΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ml)	ΞΗΡΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)	PELLET (g)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%)
ΝΕΡΟ	39,50	0,94	38,77	0,65	26,57
MCT	42,90	-	-	-	-
ΕΞΑΝΙΟ	42,30	0,19	7,77	2,19	90,40
ΛΕΜΟΝΕΝΙΟ	45,40	-	-	2,14	88,03

Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων ήταν δυνατό να υπολογιστούν μόνο για τους διαλύτες νερό και εξάνιο γιατί μπορούν να εξατμιστούν και να απομακρυνθούν πλήρως από τα εκχυλίσματα και τα πέλετ, σε αντίθεση με το MCT και το λεμονένιο που αφήνουν μια εκτεταμένη υδαρή φάση. Η μικρή απόδοση του νερού στο πέλετ, οφείλεται στην δυσκολία διαχείρισης του υλικού, το οποίο δεν μπορούσε να συλλεχθεί από το δοχείο εκχύλισης.

11.3.1.1. Ολικά Καροτενοειδή

Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε ολικά καροτενοειδή που μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 44.



Διάγραμμα 44. Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών Εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*

Από το παραπάνω Διάγραμμα, ο καλύτερος διαλύτης για την ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών είναι το λεμονένιο με συγκέντρωση 84,84 mg/ml. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο. Οι υπόλοιποι διαλύτες έχουν σαφώς χαμηλότερη ικανότητα απομάκρυνσης των καροτενοειδών, καθώς η περιεκτικότητά τους στην καλύτερη περίπτωση περιορίζεται στο μισό. Η συγκέντρωση του λεμονενίου είναι πιθανό να αποτελεί μια υπερεκτιμημένη τιμή, λόγω της απορρόφησης που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος διαλύτης. Ωστόσο, οργανοληπτικά τα εκχυλίσματα του λεμονενίου που

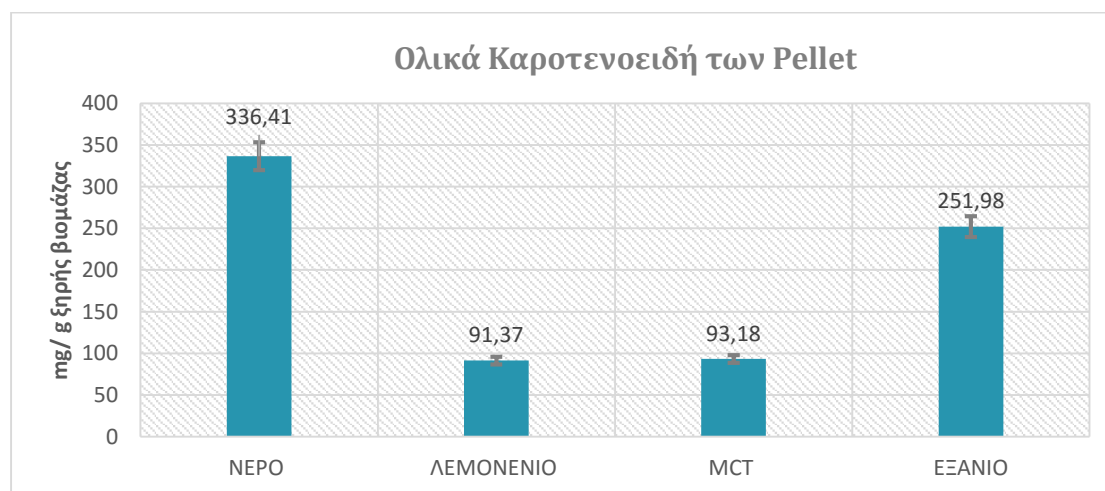
παραλήφθηκαν έδειξαν να έχουν σκουρότερο χρώμα, όπως φαίνεται από την Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Εκχυλίσματα των διαλυτών: α. Λεμονενίου, β. MCT και γ. νερού

Το εξάνιο φαίνεται ανίκανο να ανακτήσει τα ολικά καροτενοειδή της βιομάζας, γεγονός που φαίνεται και από άλλες πειραματικές εργασίες, όπως του Kim (Kim et al. 2012).

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα πέλετ εμφανίζονται στο Διάγραμμα 45.



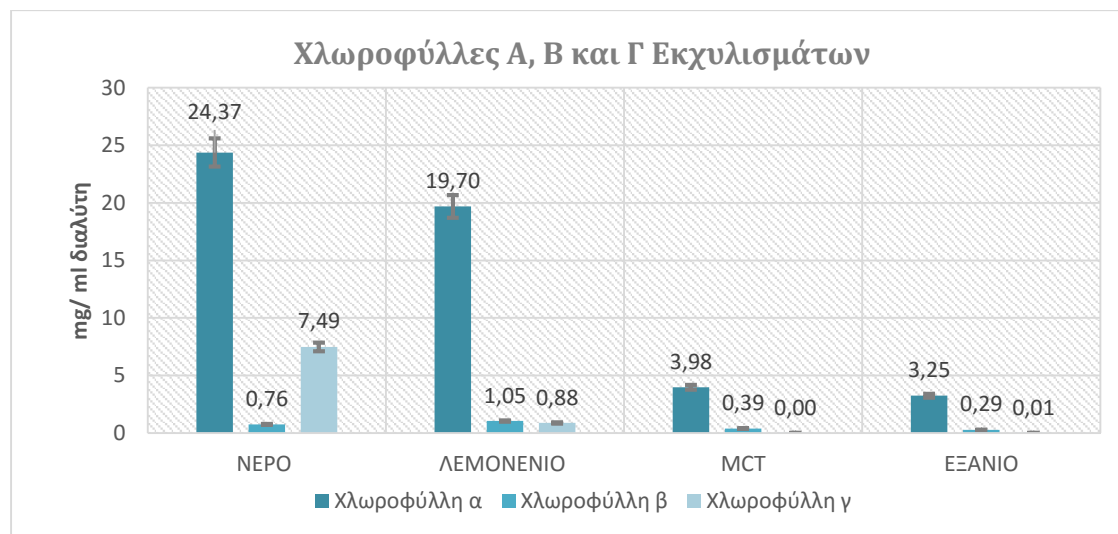
Διάγραμμα 45. Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών pellet του *Phaeodactylum Tricornutum*

Όσον αφορά τα ολικά καροτενοειδή των πέλετ, μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει το πέλετ με νερό, με πολύ μικρή διαφορά με το αντίστοιχο του εξανίου. Η υψηλή συγκέντρωση στο πέλετ εξανίου οφείλεται στο ότι το εξάνιο σαν διαλύτης δεν έχει απομακρύνει τα καροτενοειδή από την βιομάζα.

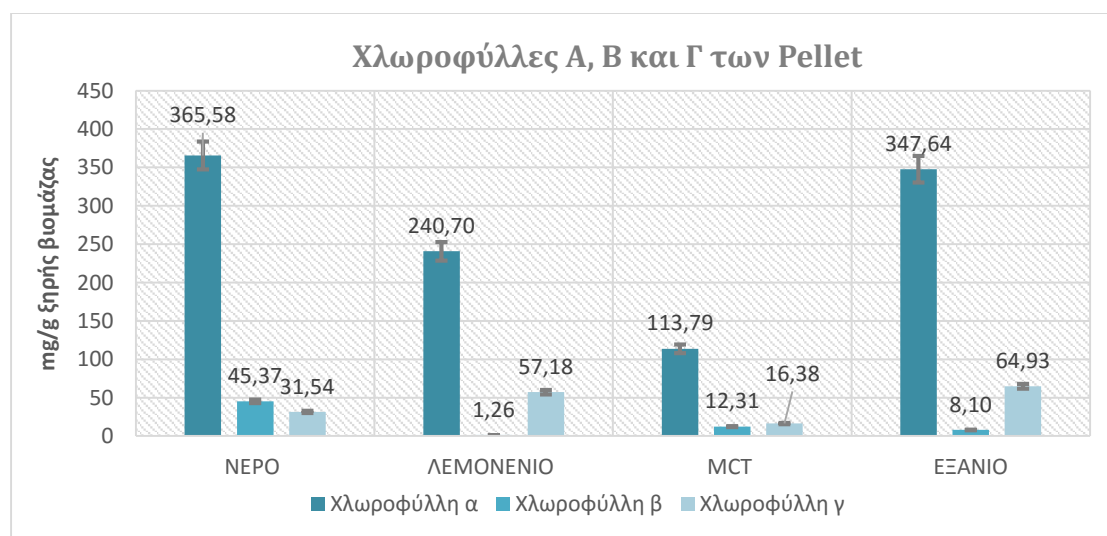
Αντίθετα, τα πέλετ του νερού είχαν υποστεί διαδικασία λυοφιλίωσης, με αποτέλεσμα οι δομές του κυττάρου να παραμένουν διογκωμένες, λόγω της παρουσίας του νερού και έτσι ο εμποτισμός με την ακετόνη να είναι ευχερέστερος και να ευνοείται η ολική απομάκρυνση των καροτενοειδών.

11.3.1.2. Χλωροφύλλες

Η συγκέντρωση σε χλωροφύλλες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 46 για τα εκχυλίσματα και στο Διάγραμμα 47 για τα πέλετ.



Διάγραμμα 46. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α, β και γ των Εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*

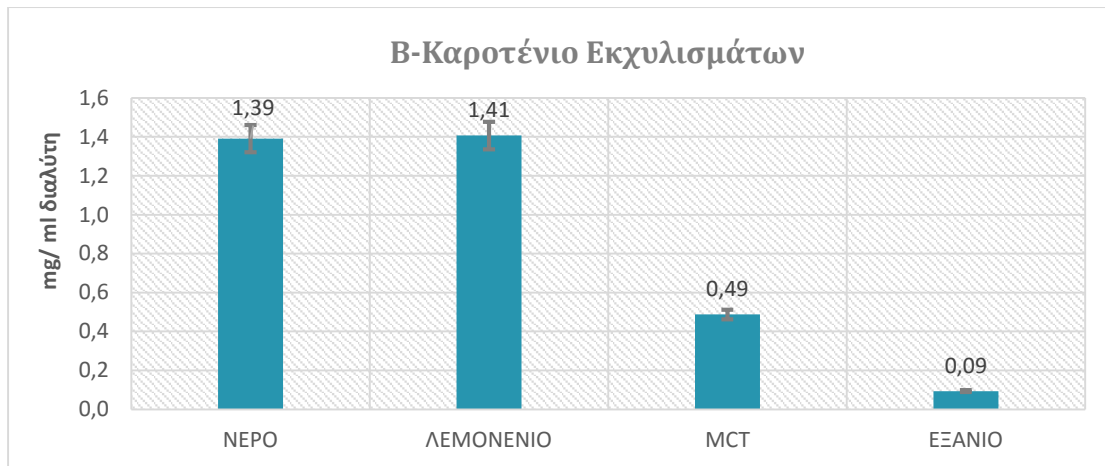


Διάγραμμα 47. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α, β και γ των pellet του *Phaeodactylum Tricornutum*

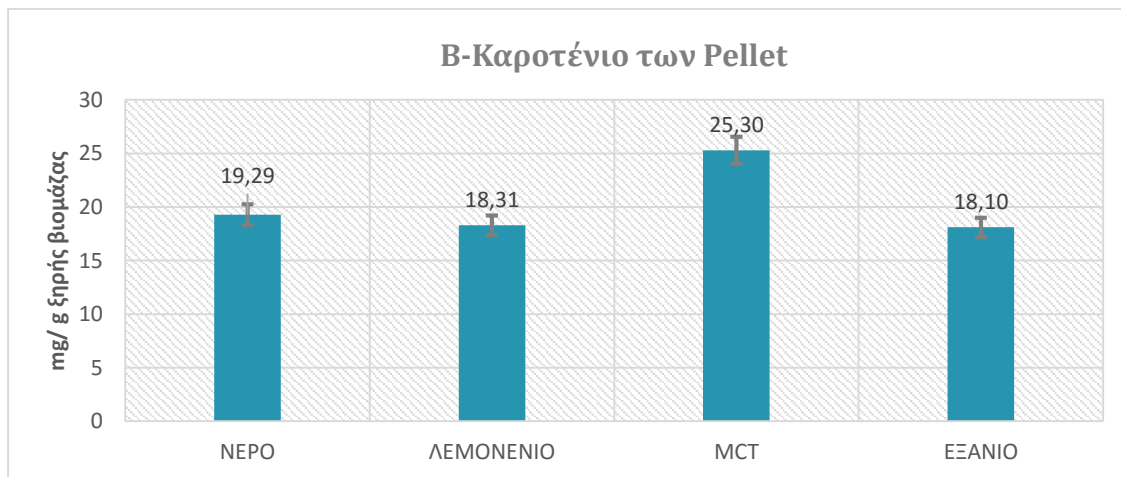
Οι χλωροφύλλες παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ με τα ολικά καροτενοειδή. Μόνη διαφορά αποτελεί το εκχύλισμα του νερού, το οποίο έχει την καλύτερη απόδοση σε χλωροφύλλες. Αυτό συμβαίνει διότι αυτές οι ενώσεις είναι υδρόφιλες και εκχυλίζονται σε υδατικά διαλύματα.

11.3.1.3. Β-Καροτένιο

Το περιεχόμενο σε β-καροτένιο αναγράφεται στα επόμενα Διαγράμματα.



Διάγραμμα 48. Συγκέντρωση β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*



Διάγραμμα 49. Συγκέντρωση χλωροφυλλών α ,β και γ των pellet του *Phaeodactylum Tricornutum*

Όπως παρατηρείται, το β-καροτένιο ακολουθεί την ίδια τάση με τα ολικά καροτενοειδή, οπότε δεν χρειάζεται περαιτέρω σχολιασμός.

Το ποσοστό του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων διαφαίνεται στον Πίνακα 24.

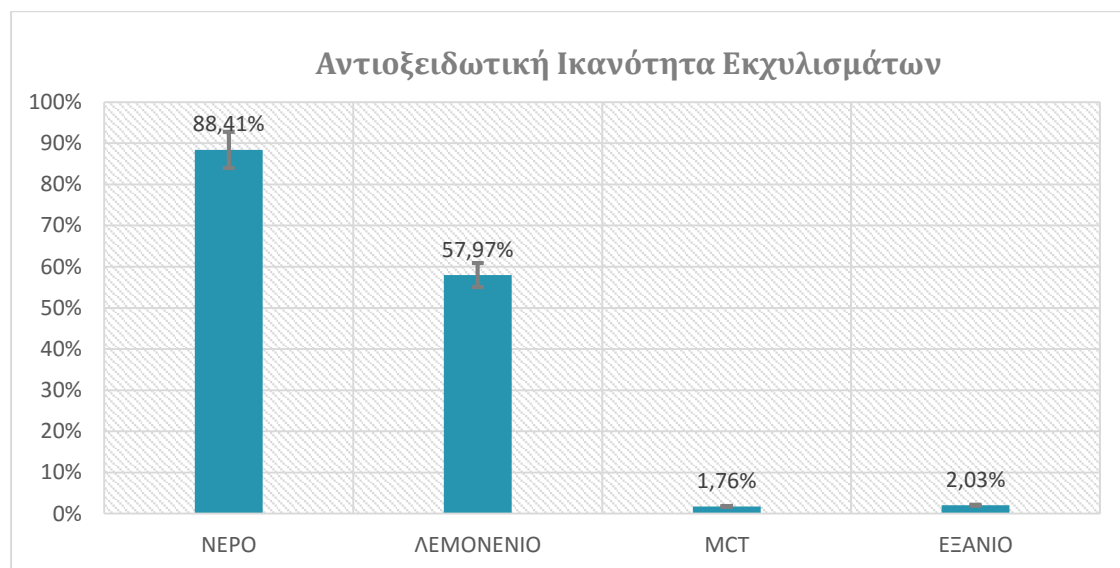
Πίνακας 24 Ποσοστό β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή των εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ Β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟΥ ΣΤΑ ΟΛΙΚΑ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ (%)
NEPO	3,17±0,16%
ΛΕΜΟΝΕΝΙΟ	1,66±0,08%
MCT	1,58±0,08%
ΕΞΑΝΙΟ	0,45±0,02%

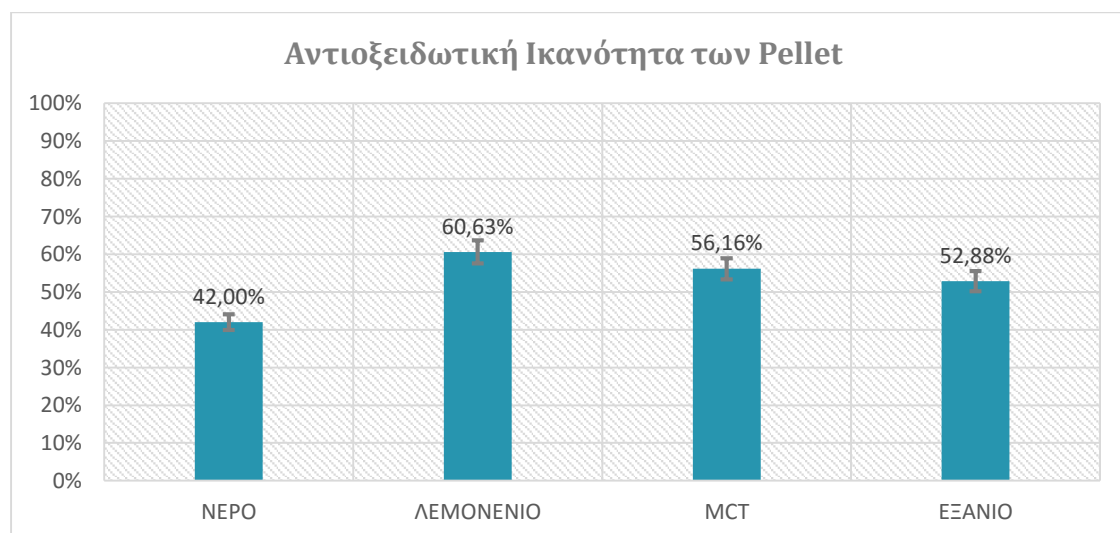
Τα ποσοστά είναι χαμηλά διότι ως κυρίαρχο καροτενοειδές στο διάτομο του *Phaeodactylum Tricornutum* αναγνωρίζεται η φουκοξανθίνη (Kim et al. 2012). Το νερό δείχνει να είναι πιο εκλεκτικό ως προς το β-καροτένιο, έχοντας το μεγαλύτερο ποσοστό του στα ολικά καροτενοειδή.

11.3.1.4. Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της χρήσης της ρίζας (DPPH•) για τα εκχυλίσματα και τα πέλετ και τα αποτελέσματα του υπολογισμού της προβάλλονται στα Διαγράμματα 50 και 51.



Διάγραμμα 50. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των Εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*



Διάγραμμα 51. Αντιοξειδωτική Ικανότητα των pellet του *Phaeodactylum Tricornutum*

Ξεκινώντας με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, το νερό και το λεμονένιο εμφανίζουν πολύ καλή εικόνα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο *Phaeodactylum Tricornutum* αναπτύχθηκε σε συνθήκες στρες, οπότε φυσικό είναι να παρήχθησαν δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως τα φαινολικά. Επειδή οι φαινολικές ενώσεις είναι γνωστές ως υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, εκχυλίζονται σε πολικούς διαλύτες. Επίσης, με την μέθοδο DPPH δεν είναι δυνατή η ανίχνευση κάποιας σημαντικής δράσης των καροτενοειδών (Müller et al. 2011), αλλά των φαινολικών ενώσεων. Για αυτούς τους λόγους το νερό έχει πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση.

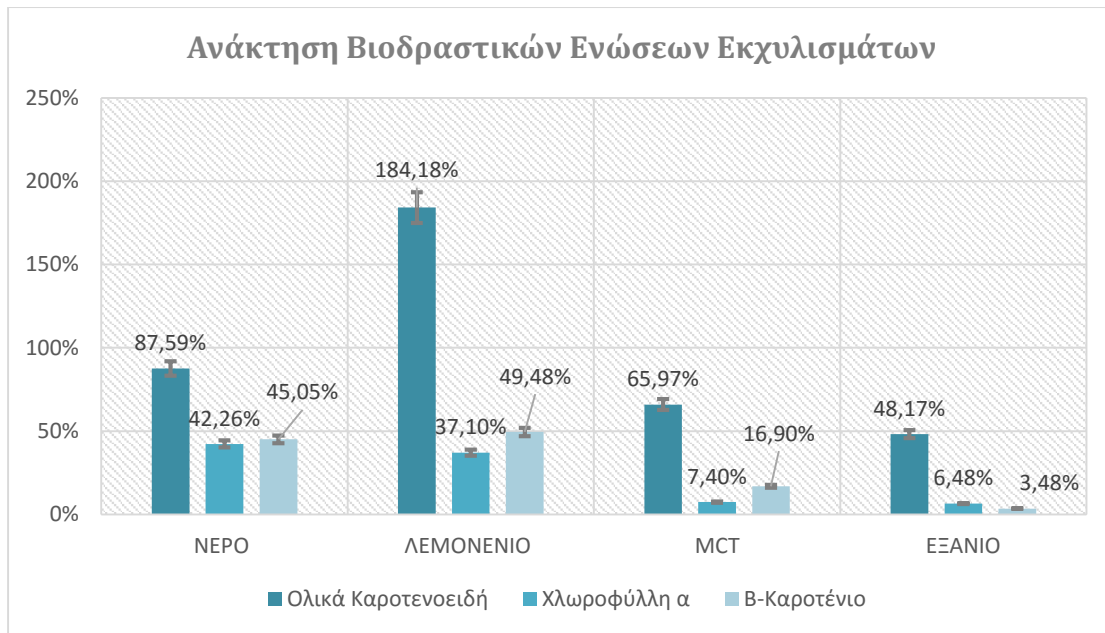
Από την άλλη πλευρά, το λεμονένιο παρουσιάζει πολύ καλή εικόνα στο Διάγραμμα 50, επειδή αφενός ο διαλύτης αυτός έχει από μόνος του αντιοξειδωτική δράση και αφετέρου επειδή είχε αποτελεσματική ανάκτηση στις βιοδραστικές ενώσεις.

Το εξάνιο και το MCT δεν είχαν ούτε ικανοποιητικές αποδόσεις στις χρωστικές, αλλά ούτε και σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Το εξάνιο γενικά, ως μη πολικός διαλύτης, αποσπά τερπένια και άλλες λιπόφιλες ουσίες που δεν έχουν αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς του εξατμιζόταν μέρος του από την κιβέτα φωτομέτρησης, με αποτέλεσμα η αντίδραση μεταξύ αυτού και της αντιοξειδωτικής ρίζας να μην είναι αποτελεσματική.

Όσον αφορά τα υπολείμματα της εκχύλισης, η αντιοξειδωτική δράση του λεμονενίου είναι υψηλότερη, ακολουθούμενη από το MCT, το εξάνιο και τέλος το νερό. Οι τρεις πρώτοι διαλύτες, ως μη πολικοί, έχουν ανακτήσει το λιπόφιλο κλάσμα της βιομάζας, αφήνοντας έτσι στο εναπομείναν πέλετ τις πολικές ουσίες που έχουν ανιχνεύουσα αντιοξειδωτική δράση. Το πέλετ του νερού, από την άλλη, έχει ακόμα αντιοξειδωτικά, κάτι που πιθανώς σημαίνει ότι έχει γίνει μερική εκχύλιση των φαινολικών.

11.3.1.5. Ανάκτηση των Βιοδραστικών Ενώσεων

Η καλύτερη σύγκριση των διαφόρων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση του διατόμου *Phaeodactylum Tricornutum*, γίνεται με τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 52.



Διάγραμμα 52. Ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών, της χλωροφύλλης α και του β-καροτενίου των Εκχυλισμάτων του *Phaeodactylum Tricornutum*

Από το Διάγραμμα, φαίνεται ότι η ανάκτηση με λεμονένιο δείχνει να ξεπερνά την συγκέντρωση καροτενοειδών της ξήρης βιομάζας, όπως υπολογίζεται από το πρωτόκολλο. Αυτό αποδεικνύει ότι ο συνδιασμός των διαλυτών με υπερήχους έχει μεγαλύτερη απόδοση από την εικοσιτετράωρη εκχύλιση με ακετόνη 90%, που προτείνει το πρωτόκολλο.

11.4. Συμπεράσματα

- Το μικροφύκος *Phaeodactylum Tricornutum* δείχνει ιδιαίτερα υψηλό περιεχόμενο σε ολικά καροτενοειδή και χλωροφύλλες.
- Το κυριότερο καροτενοειδές του είναι η φουκοξανθίνη και αυτό φαίνεται από τα ποσοστά του β-καροτενίου στα ολικά καροτενοειδή που φτάνει το 1,72%.
- Οι καλύτεροι διαλύτες για την απομάκρυνση των βιοδραστικών ενώσεων είναι το λεμονένιο και το νερό.
- Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα του μικροφύκου, οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στα εκχυλίσματα με διαλύτες το νερό και το λεμονένιο.
- Το λεμονένιο είναι κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση του *Phaeodactylum Tricornutum*, διότι εκτός από τις υψηλές αποδόσεις που εμφανίζει και το γεγονός ότι είναι βρώσιμο, είναι χρήσιμο γιατί μπορεί να εξατμιστεί από τα πέλετ του. Έτσι, τα πέλετ μένουν αυτούσια και χρησιμοποιούνται σαν ζωοτροφές με αντιοξειδωτική δράση.
- Αντίθετα, επειδή οι περισσότερες εφαρμογές του διατόμου *Phaeodactylum Tricornutum* αφορούν την βιομηχανία τροφίμων, το εξάνιο κρίνεται ακατάλληλος διαλύτης γιατί είναι πετροχημικής προέλευσης. Επίσης, οι αποδόσεις του στις χρωστικές ήταν μέτριες. Παρόλα αυτά, επιλέχθηκε ως μη

πολικός διαλύτης, ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι αποδόσεις του με τα πολικά μόρια του νερού.

- Μια πρόταση για μελλοντικά πειράματα αποτελεί η αρχική εκχύλιση του διατόμου με νερό, το οποίο αποσπά όλα τα φαινολικά και πολικά μόρια και η μετέπειτα εκχύλιση του εναπομείναντος πέλετ με λεμονένιο που αποσπά το λιπόφιλο κλάσμα.

Κεφάλαιο 12. Γενικά Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Τα μικροφύκη, όπως αποδείχθηκε, αποτελούν πλούσια πηγή βιοδραστικών ουσιών με ευρύ πεδίο εφαρμογών και με κατάλληλη επεξεργασία είναι δυνατό να δώσουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αναλόγως το είδος και την οικογένεια στην οποία ανήκουν, καθώς και στις συνθήκες στις οποίες έχουν καλλιεργηθεί, τα μικροφύκη παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς την δομή τους, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, την εκχυλισιμότητά τους και το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά συστατικά. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη για την ανάπτυξη διαδικασιών προσδιορισμού των βιοδραστικών συστατικών του κάθε μικροφύκου, ώστε να διευκολύνεται η διαδικασία επιλογής τους, αναλόγως των ουσιών-στόχων.

Στην περίπτωση των μικροφυκών, το στάδιο της ξήρανσης είναι μια απαραίτητη προεπεξεργασία της πρώτης ύλης καθώς αυτή παραλαμβάνεται από τις μονάδες καλλιέργειας με ιδιαίτερα υψηλό περιεχόμενο υγρασίας της τάξεως του 90-95%. Γενικά οι μέθοδοι αφυδάτωσης και ξήρανσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την συνολική κατανάλωση ενέργειας και το κόστος παραγωγής των προϊόντων από μικροφύκη. Όπως φάνηκε, καμία ξήρανση δεν μπορεί να χειριστεί ικανοποιητικά όλα τα είδη μικροφυκών. Η καταλληλότητα της κάθε μεθόδου εξαρτάται από τις ιδιότητες της βιομάζας του μικροφύκου, την επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος και το κόστος κεφαλαίου και παραγωγής που δύναται να διαθέσει μια βιομηχανία. Μετά το πέρας των ξηράνσεων, η βομάζα των μικροφυκών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει σε διάφορες εφαρμογές ή να επεξεργαστεί περαιτέρω, ώστε να προκύψουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η σημαντικότερη μέθοδος επεξεργασίας είναι η εκχύλιση, η οποία στοχεύει στην ανάκτηση κλασμάτων υψηλής καθαρότητας και εμπορικής σημασίας.

Τα εκχυλίσματα μπορούν να παραληφθούν τόσο από νωπή, όσο και από ξηρή βιομάζα. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης είναι αντικείμενο μελέτης και βασίζεται στην φιλικότητα προς το περιβάλλον και στην δυνατότητα εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα. Η εφαρμογή της εκχύλισης με υπερήχους αποδείχθηκε ότι πληροί αυτά τα κριτήρια, καθώς αποτελεί μια σύντομη, αποδοτική, επαναλήψιμη, οικονομική και βιομηχανικά εφαρμόσιμη μέθοδο, η οποία ανακτά υψηλό ποσοστό του βιοδραστικού περιεχομένου, διατηρώντας αναλλοίωτη την δράση του. Η υψηλή αποδοτικότητα της εκχύλισης διατηρήθηκε ακόμα και στην περίπτωση εφαρμογής ήπιων διαλυτών, οι οποίοι μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων, όπως είναι φυτικά έλαια, αιθέρια έλαια και υδατικά συστήματα. Τα υπολείμματα των εκχυλίσεων αυτών παρουσίασαν υψηλό θρεπτικό περιεχόμενο καθιστώντας τα πλήρως εκμεταλλεύσιμα σε άλλες εφαρμογές, όπως τροφή για υδατοκαλλιέργειες.

Βάσει των ανωτέρων συμπερασμάτων, διαμορφώνονται οι ακόλουθες προτάσεις για μελλοντική έρευνα. Καταρχήν, θα μπορούσαν να μελετηθούν, ως προς τις ξηράνσεις και τις εκχυλίσεις, και άλλες ποικιλίες μικροφυκών, που να ανήκουν σε διαφορετικά βασίλεια και φυλές, ώστε να γίνει περαιτέρω σύγκριση μεταξύ τους και να μελετηθεί η επίδραση της ταξινόμησης των μικροφυκών στο βιοδραστικό τους περιεχόμενο.

Επόμενη πρόταση αποτελεί η μελέτη και άλλων μεθόδων ξήρανσης κατάλληλων για θερμοευαίσθητα προϊόντα υψηλής βιολογικής αξίας, όπως ξήρανση με ψεκασμό με ή χωρίς κενό, ξήρανση με θερμά τύμπανα ή συνδυασμό ήδη εφαρμοσμένων μεθόδων, όπως, ατμοσφαιρική ή ηλιακή με ξήρανση υπό κενό.

Η πρόταση μελέτης παραπάνω μεθόδων, θα μπορούσε να εφαρμοστεί και στην περίπτωση της εκχύλισης, όπου η εκχύλιση με υπερήχους θα μπορούσε να συγκριθεί με άλλες τεχνικές, όπως η εκχύλιση με μικροκύματα και η υπερκρίσιμη εκχύλιση, ή συνδυασμό τεχνικών, όπως μικροκυμάτων και υπερήχων.

Σχετικά με τις μεθόδους προσδιορισμού του βιοδραστικού περιεχομένου, θα μπορούσε να γίνει ανάλυση των δειγμάτων με στήλη υγρής χρωματογραφίας (HPLC), έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός των βιοδραστικών συστατικών. Εκτός από τη μελέτη των αντιοξειδωτικών, θα μπορούσε να γίνει και μελέτη των πρωτεϊνών που περιέχει το υλικό καθώς, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει μεγάλο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Επιπρόσθετα, η πραγματοποίηση πρωτοκόλλων, όπως ανάλυση με frag και προσδιορισμού περιεχομένου σε φαινολικά, φλαβονοειδή και λιπαρά οξέα αποτελούν μια ενδιαφέρουσα πρόταση για μελλοντική έρευνα. Τέλος, θα μπορούσε να γίνει ανάλυση του κύκλου ζωής των υλικών.

Βιβλιογραφία

- Abdelwahed, W. et al., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), pp.1688–1713.
- Abreu, A.P. et al., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, pp.61–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>.
- Agustini, T.W. et al., 2015. Comparative Study of Bioactive Substances Extracted from Fresh and Dried *Spirulina* sp. *Procedia Environmental Sciences*, 23(Ictcred 2014), pp.282–289. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029615000432>.
- Amar-yuli, I. et al., 2009. Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, pp.21–32.
- Amar-Yuli, I., Aserin, A. & Garti, N., 2008. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. *The journal of physical chemistry. B*, 112(33), pp.10171–80.
- An-Erl King, V., Liu, C.F. & Liu, Y.J., 2001. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration. *Food Research International*, 34(2-3), pp.167–175.
- Babadzhanov, A.S. et al., 2004. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(3), pp.276–279.
- Badger, M.R. & Price, G.D., 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), pp.609–622.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P., 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, Available at: <http://books.google.co.in/books?id=t4ZQRWvr510C>.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), pp.207–10. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497500600139X>.
- Ben-Amotz, a & Avron, M., 1983. On the Factors Which Determine Massive beta-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant physiology*, 72(3), pp.593–597.
- Bitaubé Pérez, E., Caro Pina, I. & Pérez Rodríguez, L., 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), pp.520–525.
- Bongiorni, L. & Pietra, F., 1996. Marine natural products for industrial applications. *Section Title: History, Education, and Documentation*, (2), pp.54–58.
- Borowitzka, M. a., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), pp.313–321.
- Boussiba, S. & Richmond, A.E., 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 125(1-2), pp.143–147.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, pp.25–30.

- Brányiková, I. et al., 2011. Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), pp.766–776.
- Brennan, L. & Owende, P., 2013. Biofuels from Microalgae: Towards Meeting Advanced Fuel Standards. In *Advanced Biofuels and Bioproducts*. pp. 553–599. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-3348-4>.
- 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(2), pp.557–577.
- Carvalho, A.P. et al., 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), pp.1275–1288.
- Cerón MC1, García-Malea MC, Rivas J, Acien FG, Fernandez JM, Del Río E, Guerrero MG, M.E., 2007. Antioxidant activity of Haematococcus pluvialis cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. Available at: 10.1007/s00253-006-0743-5.
- Chaumont, D., 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(6), pp.593–604.
- Chemat-Djenni, Z. et al., 2010. Carotenoid Extraction from Tomato Using a Green Solvent Resulting from Orange Processing Waste. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(2), pp.139–147. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643803>.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), pp.294–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350212>.
- Costa, J. a V et al., 2000. Modelling of growth conditions for cyanobacterium Spirulina platensis in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), pp.15–18.
- Costa, J.A. V et al., 2001. Different nitrogen sources and growth responses of Spirulina platensis in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17(5), pp.439–442. Available at: <http://search.proquest.com/docview/18256510?accountid=27991> \n http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:asfamarine&atitle=Different+nitrogen+sources+and+growth+resp.
- Danesi, E.D.G. et al., 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), pp.329–335.
- Day, J.G., Slocombe, S.P. & Stanley, M.S., 2012. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresour. Technol.*, 109, pp.245–51. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411006936>.
- Demirbas, A., 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12), pp.2738–2749. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>.
- Denery, J.R. et al., 2004. Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina and kavalactones from Piper methysticum. *Analytica Chimica Acta*, 501(2), pp.175–181.

- Deng, R. & Chow, T.J., 2010. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), pp.33–45.
- Dey, S. & Rathod, V.K., 2013. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), pp.271–276. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.010>.
- Dey, S. & Rathod, V.K., 2013. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), pp.271–6.
- Diamante, L.M. & Munro, P.A., 1993. Mathematical modelling of the thin layer solar drying of sweet potato slices. *Solar Energy*, 51(4), pp.271–276. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038092X93901225>.
- Fajardo, A.R. et al., 2007. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(2), pp.120–126.
- Falkowski, P.G. & Owens, T.G., 1980. Light-Shade Adaptation : TWO STRATEGIES IN MARINE PHYTOPLANKTON. *Plant physiology*, 66(4), pp.592–595.
- Gantar, M. & Svirčev, Z., 2008. Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. *Journal of Phycology*, 44(2), pp.260–268.
- Giri, S.K. & Prasad, S., 2007. Drying kinetics and rehydration characteristics of microwave-vacuum and convective hot-air dried mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 78(2), pp.512–521.
- González, M.J.I. et al., 1998. Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), pp.1735–1740.
- Greep, R.O., 1998. Whither the global population problem. *Biochemical Pharmacology*, 55(4), pp.383–386.
- Guedes, a C. & Malcata, F.X., 2012. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. *Aquaculture*, p.390.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. & Malcata, F.X., 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4), pp.625–644.
- Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibanez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. *Food Chemistry*, 98(1), pp.136–148. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605004772>.
- Holman, B.W.B. & Malau-Aduli, A.E.O., 2013. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(4), pp.615–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860698>.
- Huang, Z. et al., 2007. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 100(3), pp.1137–1143.
- Isichei, A.O., 1990. The role of algae and cyanobacteria in arid lands. A review. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 4(January 2015), pp.1–17.
- Jaime, L. et al., 2005. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28(16), pp.2111–2119.

- Jassby, A.D., 1988. Spirulina: a model for microalgae as human food. In *Algae and human affairs*. pp. 149–180. Available at: <http://web.me.com/adjassby/pubs/jassby1988tg-spirulina>.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W., 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography*,
- Jorquera, O. et al., 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), pp.1406–1413. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>.
- Junior, M.R.M. et al., 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chemistry*, 116(1), pp.8–12.
- Kang, C.D. & Sim, S.J., 2008. Direct extraction of astaxanthin from Haematococcus culture using vegetable oils. *Biotechnology Letters*, 30(3), pp.441–444.
- Karadeniz, A. et al., 2008. Spirulina platensis protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytotherapy research : PTR*, 22(11), pp.1506–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690652>.
- Kerby, N.W. & Raven, J.A., 1985. Transport and Fixation of Inorganic Carbon by Marine Algae. *Advances in Botanical Research*, 11, pp.71–123.
- Kim, S.M. et al., 2012. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga Phaeodactylum tricornutum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(7), pp.1843–1855.
- Kovač, D. et al., 2013. Algae in food and feed. *Food Feed Res*, 40(1), pp.21–31. Available at: http://fins.uns.ac.rs/uploads/Magazines/magazine_123/Algae-in-food-and-feed.pdf.
- Krichnavaruk, S. et al., 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis with vegetable oils as co-solvent. *Bioresource Technology*, 99(13), pp.5556–5560.
- Kruse, O. & Hankamer, B., 2010. Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), pp.238–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.012>.
- Kuhad, R.C. et al., 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. *Nutrition reviews*, 55(3), pp.65–75.
- Kurt, Oguz. Taskin, Ergun. Ozturk, Mehmet. Caki, Zerrin. Taskin, E., 2010. Antimicrobial and antitumoural activities of marine algae. *Review of Hydrobiology*, 3(1), pp.37–50.
- Kwak, H.W. et al., 2014. Fabrication of Phaeodactylum tricornutum extract-loaded gelatin nanofibrous mats exhibiting antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, pp.198–204.
- Kwang, H.C. et al., 2010. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from chlorella vulgaris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp.793–797.
- Kwang, H.C., Song, Y.I.K. & 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(22), pp.10521–10526.
- Lewicki, P.P., 2006. Design of hot air drying for better foods. *Trends in Food Science and*

- Technology*, 17(4), pp.153–163.
- Li, J. et al., 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.568–574. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>.
- Lin, L.P., 1985. Microstructure of spray-dried and freeze-dried microalgal powders. *Food Microstructure*, 4(2), pp.341–348.
- Lincoln, E.P., Wilkie, A.C. & French, B.T., 1996. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 10(1), pp.63–68. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0961953495000550>.
- Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), pp.160–167. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779900014335>.
- Mabeau, S. & Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4(4), pp.103–107.
- Macías-Sánchez, M.D. et al., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77(3), pp.948–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064074>.
- 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(1), pp.217–232.
- Mohammed, M.K., 2011. Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA). *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(6), pp.4973–4979.
- Molina, E. et al., 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), pp.113–131.
- Molina Grima, E. et al., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70(1), pp.231–247. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165699000784>.
- Morist, A. et al., 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37(5), pp.535–547.
- Mulbry, W.W. & Wilkie, A.C., 2001. Growth of benthic freshwater algae on dairy manures. *Journal of Applied Phycology*, 13, pp.301–306.
- Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V., 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), pp.139–148.
- Norsker, N.H. et al., 2011. Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, 29(1), pp.24–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>.
- Oliveira, E.G. et al., 2010. Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: Evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8), pp.1572–1578.

- Oliveira, E.G. et al., 2008. Phycocyanin content of *Spirulina Platensis* dried in spouted bed and thin layer. *Journal of Food Process Engineering*, 31(1), pp.34–50.
- De Oliveira, M. a C.L. et al., 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, 7(4), pp.261–275.
- Onayemi, O. & Badifu, G.I.O., 1987. Effect of blanching and drying methods on the nutritional and sensory quality of leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 37(4), pp.291–298.
- Orikasa, T. et al., 2014. Impacts of hot air and vacuum drying on the quality attributes of kiwifruit slices. *Journal of Food Engineering*, 125(1), pp.51–58. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.027>.
- Orosa, M. et al., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), pp.373–378.
- Pittman, J.K., Dean, A.P. & Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), pp.17–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., et al., 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), pp.245–253. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Garc??a-Blairsy Reina, G., et al., 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), pp.245–253.
- Posten, C. & Schaub, G., 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view. *Journal of Biotechnology*, 142(1), pp.64–69.
- Powell, N. et al., 2011. Phosphate release from waste stabilisation pond sludge: Significance and fate of polyphosphate. *Water Science and Technology*, 63(8), pp.1689–1694. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955822685&partnerID=40&md5=d091fc73555d99363d178fc35832cd4f>.
- Priyadarshani, I. & Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), pp.89–100.
- Pulz, O. & Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, pp.635–648.
- Radakovits, R., Eduafo, P.M. & Posewitz, M.C., 2011. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. *Metabolic Engineering*, 13(1), pp.89–95.
- Rangel-Yagui, C.D.O. et al., 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(2), pp.133–141.
- Reynolds, C., 2006. *Ecology of Phytoplankton*,
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy/edited by Amos Richmond.*, Available at: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UMARPA.xis&method=post&formato=2&canti>

dad=1&expresion=mfn=004637.

- Richmond, A., 1992. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal of Applied Phycology*, 4, pp.281–286.
- Roberto, D. et al., 2010. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 106(1), pp.38–44.
- Rostagno, M. a., Palma, M. & Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), pp.119–128.
- Ruen-ngam, D., Shotipruk, A. & Pavasant, P., 2011. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 46(1), pp.64–70. Available at: <Go to ISI>://WOS:000285518200007.
- Rupérez, P., 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79(1), pp.23–26.
- Safi, C. et al., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp.265–278. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114002342>.
- Samuelsson, G. & Oquist, G., 1977. A Method for Studying Photosynthetic Capacities of Unicellular Algae Based on in vivo Chlorophyll Fluorescence. *Physiologia Plantarum*, 40(4), pp.315–319. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04080.x>.
- Sarada, R. et al., 2006. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), pp.7585–7588.
- Sarada, R., Pillai, M.G. & Ravishankar, G. a., 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8), pp.795–801.
- Schwartz, R.E. et al., 1990. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of Industrial Microbiology*, 5, pp.113–124.
- Se-Kwon Kim, K.C. ed., 2015. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, wiley.
- Silveira, S.T. et al., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8), pp.1629–1634.
- Sogi, D.S., Siddiq, M. & Dolan, K.D., 2015. Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), pp.564–568.
- Spolaore, P. et al., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), pp.87–96.
- Therdthai, N. & Zhou, W., 2009. Characterization of microwave vacuum drying and hot air drying of mint leaves (*Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen). *Journal of Food Engineering*, 91(3), pp.482–489.

- Vigani, M. et al., 2015. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), pp.81–92. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414002787>.
- VijayaVenkataRaman, S., Iniyan, S. & Goic, R., 2012. A review of solar drying technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), pp.2652–2670. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112000081>.
- Virost, M. et al., 2008. Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-Hexane. *Chromatographia*, 68(3-4), pp.311–313. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-008-0696-1>.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*, Available at: https://books.google.co.jp/books/about/Spirulina_Platensis_Arthrospira.html?id=IKaKEqo6pB8C&pgis=1
<http://books.google.com/books?id=IKaKEqo6pB8C&pgis=1>.
- Wang, L. et al., 2012. Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, pp.120–127.