



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΕΜΠ
Σχολή Χημικών Μηχανικών,
Τομέας II: Ανάλυσης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης
Διεργασιών και Συστημάτων,
Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών

Πράσινες διεργασίες εκχύλισης.
Σχεδιασμός λειτουργικών
εκχυλισμάτων μικροφυκών,
οικολογική παραγωγή αυτών και
εφαρμογή τους στη βιομηχανία
τροφίμων.

Διδακτορική Διατριβή
Μάριος Χρόνης του Παναγιώτου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μαγδαληνή Κροκίδα, Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, 2023



National Technical University of Athens,
School of Chemical Engineering
Department of Process Analysis and Plant Design,
Laboratory of Process Analysis and Design (LPAD)

Design of green extraction processes for the recovery of bioactive extracts from microalgae and “green” application of them in the agro-food industry.

A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemical Engineering – Processes Analysis and Design

Marios P. Chronis

Supervisor: Magdalini C. Krokida, Associate Professor NTUA

ATHENS, GREECE, 2023

Supervising Committee

M. Krokida, Professor NTUA (S.Ch.Eng), (Head Supervisor)

A. Pappa, Professor NTUA, (S.Ch.Eng.)

P. Taoukis, Professor NTUA, (S.Ch.Eng.)

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Πρόλογος και Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μια ερευνητική προσπάθεια για την παραγωγή και αξιοποίηση μικροφυκών, την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από αυτά με πράσινες τεχνολογίες, με σκοπό την παραλαβή φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και τελικά, την εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων. Τα προϊόντα αυτά θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα από την βιομηχανία τροφίμων και ποτών, τη βιομηχανία ζωοτροφών, την βιομηχανία παραγωγής συμπληρωμάτων διατροφής, την βιομηχανία καλλυντικών καθώς επίσης και τη φαρμακοβιομηχανία. Σκοπός είναι να βελτιώσουν τόσο τη λειτουργική δράση εμπορικών προϊόντων όσο και το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα ενώ προσφέρουν θετικά μηνύματα στην επικοινωνία με τον καταναλωτή.

Σε συνέχεια της έρευνας για την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών από φυτά και μικροφύκη ως εναλλακτική πηγή αντιοξειδωτικών, χρωστικών, πολυακόρεστων λιπαρών αλλά και βελτιωτικών στη βιομηχανία τροφίμων και άλλων προϊόντων επικεντρωνόμαστε στην αριστοποίηση των μεθόδων εκχύλισης και απομόνωσης των εν λόγω ουσιών από οικονομικές, επαρκείς και διαθέσιμες πηγές. Επιπλέον εστιάζουμε στην παραγωγή προϊόντων που μπορούν να ενσωματωθούν σε τελικά εμπορικά προϊόντα με εφικτές ή και υφιστάμενες στη βιομηχανία τεχνολογίες.

Έχοντας ήδη την πίεση των καταναλωτών αλλά και της νομοθεσίας, οι βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών θέλουν άμεσα να αντικαταστήσουν όλα τα συνθετικά συστατικά πετροχημικής προέλευσης με δυνητικά επικίνδυνες για την υγεία ουσίες. Τα κυριότερα από αυτά έχουν στόχο τη βελτίωση του χρώματος αλλά και την αντιοξειδωτική προστασία των τελικών προϊόντων όπως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) ή βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA), ύποπτα καρκινογόνα (Namiki 1990) και τα τεχνητά χρώματα, όπως το λαμπρό κυανό FCF (E133), η ταρτραζίνη (E102), το πράσινο S (E142), το κίτρινο Sunset FCF (E110), η ερυθροσίνη (E127) και το ερυθρό (E129), τα οποία χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε προϊόντα διατροφής που απευθύνονται συχνά σε παιδιά και η νομοθεσία τα έχει ήδη περιορίσει καθώς υπάρχουν υποψίες και μελέτες ότι αποτελούν πιθανούς παράγοντες διαταραχής συμπεριφοράς, αλλεργιών και άλλων επιπτώσεων στην υγεία των ανθρώπων (Socaciu 2008, Gultekin & Dofuc 2012, Weiss 2012, Nigg et al. 2012, Randhawa et al. 2009) [374].

Ως παράδειγμα εναλλακτικής, θα αναφερθούμε στα εκχυλίσματα ασταξανθίνης και άλλων καροτενοειδών που ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το φύκος *Haematococcus pluvialis* καθώς επίσης, και εκχυλίσματα εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA), εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) ωμέγα-3- αλλά και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το διάτομο *Phaeodactylum tricorutum*. Στόχος είναι η μελέτη των διεργασιών εκχύλισης και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων τους με σκοπό τη μέγιστη ανάκτηση των παραπάνω ουσιών. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη βέλτιστη διεργασία

εκχύλισης είτε ενσωματώθηκαν σε προϊόντα γαλακτωμάτων για την άμεση εφαρμογή τους στη βιομηχανία χυμών ή αντικατέστησαν ζωικής προέλευσης πρωτεΐνες και λιπαρά στην παρασκευή αρτοποιημάτων.

Για την απομόνωση λειτουργικών συστατικών με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση από μικροφύκη χρησιμοποιήθηκαν καινοτόμες και φιλικές προς το περιβάλλον μέθοδοι εκχύλισης. Η διατριβή αυτή αποσκοπεί, μέσω των τεχνικών εκχύλισης που αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν, στην εφαρμογή αυτών των πλέον πράσινων διεργασιών στην ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών και με αυτό να συνεισφέρει στην μέγιστη αξιοποίηση των μικροφυκών για την παραγωγή προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων.

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών του τομέα ΙΙ της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Μαγδαληνής Κροκίδα με επίσημο χρόνο έναρξης τον Σεπτέμβριο του 2012.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ. Μ. Κροκίδα, για την ανάθεση του ενδιαφέροντος θέματος αυτής της διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, την άρτια καθοδήγηση και τις συμβουλές της στα διάφορα στάδια της εργασίας, καθώς, χωρίς αυτή δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Σημαντική ήταν ακόμα η συνεισφορά πολλών συναδέλφων και καθηγητών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους και το προσωπικό του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ανάλυση των εκχυλισμάτων που αναπτύχθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Π. Ταούκη και την Καθηγήτρια κα Α. Παππά Επίσης, ευχαριστώ την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel) για την προσφορά των μικροφυκών και την εταιρεία Aspis SA (Greece) για την προσφορά αιθερίων ελαίων, τη δημιουργία γαλακτωμάτων και την εφαρμογή τους σε τελικά προϊόντα χυμών.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους φίλους και συνεργάτες μου, το προσωπικό του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, την Δρ Μαρίνα Στραμάρκου, τον Δρ. Χρ. Μπουκουβάλα, τον κ. Π. Μιχαηλίδη, τον Δρ. Ν. Παναγιώτου και τους Δρ. Β. Οικονομοπούλου, , Δρ. Π. Ελένη, Δρ. Ι. Κατσαβού, Δρ. Σ. Παπαδάκη, Δρ. Β.Μ. Χριστοπούλου, Υ.Δ. Κ. Ταταράκη και Δρ Κ. Κυριακοπούλου, για την στήριξη, την κατανόηση και την βοήθεια τους σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές και τώρα πια Χημικούς Μηχανικούς που εκπόνησαν την διπλωματική τους εργασία στο εργαστήριο αυτό και μαζί καταφέραμε να εξελιχθούμε και να βρούμε λύσεις στα προβλήματα που προέκυψαν. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά την Υ.Δ. κ. Χ. Δρόσου, την κ. Α. Μπάμπουλη, την κ. Θ.-Β. Μισυρλή, την κ. Μ. Ιωαννίδη και κ. Σ. Σαμψών. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια μου και τους δικούς μου ανθρώπους που

χωρίς την βοήθεια και την στήριξη τους δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή και τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την κατανόηση και την υπομονή τους.

Μάριος Π. Χρόνης

Αθήνα, Νοέμβριος 2023

Σύνοψη

Στην διατριβή αυτή, μελετήθηκαν βιομηχανικά εφαρμόσιμες διεργασίες εκχύλισης για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων υψηλής αξίας από μικροφύκη. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα ασταξανθίνης και άλλων καροτενοειδών ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το φύκος *Haematococcus pluvialis* καθώς επίσης και εκχυλίσματα εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA), εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) και ωμέγα-3-λιπαρών οξέων ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* ενώ έλαιο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και πρωτεΐνες ανακτήθηκαν από το φύκος *Cholera Vulgaris*.

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των διεργασιών εκχύλισης και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων τους με σκοπό τη μέγιστη ανάκτηση των παραπάνω ουσιών. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη βέλτιστη διεργασία εκχύλισης ενσωματώθηκαν σε προϊόντα αναψυκτικών και χυμών αλλά και προϊόντων αρτοποιίας.

Η προσθήκη εκχυλισμάτων πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από τα φύκη βοήθησαν στην ανάπτυξη φυσικών προϊόντων με αυξημένη διατροφική αξία και βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως τη φυσική ενίσχυση του χρώματος των προϊόντων λόγω της παρουσίας των καροτενοειδών, καθώς επίσης και την επέκταση της διατηρησιμότητας των προϊόντων λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων. Επίσης, εκχύλισμα ελαίου και πρωτεΐνης από το φύκος *Cholera Vulgaris* χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο ζωικής λίπους και αυγού σε ποσοστό 100% για την παραγωγή αρτοσκευάσματος τύπου Brioche με εξαιρετικά αποτελέσματα. Με αυτή την τεχνική δίνεται η δυνατότητα παραγωγής νέων προϊόντων που καλύπτουν σύγχρονες διατροφικές τάσεις όπως Vegan, Vegetarian & Flexitarian.

Τέλος, αξιοποιώντας την εμπειρία των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης γίνεται μια συγκριτική μελέτη ανάμεσά στις προκατεργασίες και παραθέτουμε τα σχετικά αποτελέσματα.

Περίληψη

Στην διατριβή αυτή, μελετήθηκαν βιομηχανικά εφαρμόσιμες διεργασίες εκχύλισης ως προς την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων υψηλής αξίας από μικροφύκη. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα ασταξανθίνης και άλλων καροτενοειδών ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το φύκος *Haematococcus pluvialis* καθώς επίσης και εκχυλίσματα εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA), εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) και ωμέγα-3- λιπαρών οξέων ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* αλλά και από το φύκος *Cholera Vulgaris*.

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των διεργασιών εκχύλισης και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων τους με σκοπό τη μέγιστη ανάκτηση των παραπάνω ουσιών. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη βέλτιστη διεργασία εκχύλισης ενσωματώθηκαν σε προϊόντα αναψυκτικών και χυμών αλλά και προϊόντων αρτοποιίας.

Η προσθήκη εκχυλισμάτων πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από το φύκος *Haematococcus pluvialis* και το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* σε προϊόντα χυμών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φυσικών προϊόντων με αυξημένη διατροφική αξία και βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η χρήση αυτών των εκχυλισμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη φυσική ενίσχυση του χρώματος των προϊόντων λόγω της παρουσίας των καροτενοειδών, καθώς επίσης και την επέκταση της διατηρησιμότητας τους λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* ευνοεί την επέκταση του χρόνου ζωής των προϊόντων και την αύξηση της διατροφικής τους αξίας. Συνεπώς, η προσθήκη των παραπάνω εκχυλισμάτων προωθεί την αντικατάσταση των ευρέως χρησιμοποιούμενων συνθετικών προσθέτων όπως το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) ή την βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA) τα οποία τα τελευταία χρόνια θεωρούνται ύποπτα καρκινογόνα.

Η ξηρή βιομάζα από το φύκος *Haematococcus pluvialis* παραχωρήθηκε από την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχύλισεις ήταν αναλυτικής ποιότητας ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις ήταν ποιότητας HPLC. Η ακετόνη, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η μεθανόλη, ο βουτυλομεθυλαιθέρας, το νερό, το άλας άνυδρου θειικού νατρίου, το φωσφορικό οξύ αγοράστηκαν από την εταιρεία Fisher scientific, UK. Το ένζυμο χολινεστεράσης και τα πρότυπα ασταξανθίνης και trans-beta-apo-8'-carotenal αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (USA). Το MCT και το έλαιο πορτοκαλιού παραλήφθηκαν από την εταιρεία ΑΣΠΙΣ Α.Ε.

Πριν από την εκχύλιση τα μικροφύκη υποβλήθηκαν σε ξήρανση προκειμένου να αποφευχθεί η μικροβιακή αλλοίωση τους και να διατηρηθεί το οργανικό τους

περιεχόμενο. Η ανάκτηση διεξήχθη μέσω συμβατικών τεχνικών εκχύλισης με τους τυπικούς οργανικούς διαλύτες καθώς και με εναλλακτικούς, περιβαλλοντικά φιλικότερους διαλύτες όπως τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών ενώ εφαρμόστηκαν και νέες μέθοδοι που αξιοποιούν μικροκύματα ή υπερήχους. Η χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων βρέθηκε να ενισχύει την αποτελεσματικότητα της ανάκτησης των βιοδραστικών ενώσεων, ακόμη και όταν χρησιμοποιούν πιο πράσινους / ηπιότερους διαλύτες. Η αποτελεσματικότητα των εκχυλίσεων εξετάστηκε υπολογίζοντας τις αποδόσεις τους, ενώ και η επιλεκτικότητα των διεργασιών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικά πρωτόκολλα και αναλύσεις υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας.

Επίσης, σε μια άλλη διεργασία, εκχύλισμα ελαίου από το φύκος *Cholera Vulgaris* χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο ζωικής λίπους σε ποσοστό 100% για την παραγωγή αρτοσκευάσματος τύπου Brioche με εξαιρετικά αποτελέσματα. Η ξηρή βιόμαζα *Cholera Vulgaris* αποκτήθηκε από την εταιρεία Mega Foods και χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την εκχύλιση του βιοδραστικού ελαίου. Ακολουθώντας τεχνική εκχύλισης με ισοπροπανόλη, υποβοηθούμενη με υπερήχους σε συνθήκες $T=45^{\circ} C$, $P=400$ Watt, $F=25$ kHz ανακτήθηκε το κλάσμα των λιπών. Ακολούθως αποχρωματίστηκε με ενεργό άνθρακα και ομογενοποιήθηκε προς ανάλυση του τύπου των Ω3 λιπαρών οξέων και προετοιμάστηκε για την εφαρμογή σε ζύμη για αρτοσκεύασμα τύπου Brioche.

Από το ίδιο φύκος έγινε υδατική εκχύλιση πρωτεϊνών οι οποίες στη συνέχεια ανακτήθηκαν με φυγοκέντριση και καθαρίστηκαν με φίλτραση. Η σταθεροποίησή τους έγινε με λυοφιλίωση ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σκόνη για την υποκατάσταση του αυγού που είναι η κλασική πηγή πρωτεΐνης στην συγκεκριμένη συνταγή. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα και αξιολογήθηκε η μέθοδος.

Ακολούθως, το επόμενο στάδιο ήταν η εφαρμογή των υποκατάστατων λίπους και πρωτεΐνης στην συνταγή του αρτοσκευάσματος Brioche και η οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος με αντικειμενικά κριτήρια αποδοχής. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά, δίνοντας εξίσου ή καλύτερα οργανοληπτικά στοιχεία στο προϊόν με εξέχουσα επίδραση αυτή στην αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Η συγκεκριμένη εργασία έχει ήδη δημοσιευτεί από την ερευνητική ομάδα.

Τέλος, αξιοποιώντας την εμπειρία των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης γίνεται μια συγκριτική μελέτη ανάμεσά τους και παραθέτουμε τα σχετικά αποτελέσματα στη παρούσα διατριβή. Η συγκεκριμένη εργασία μέρος της οποίας είναι και στην παρούσα διατριβή, έχει ήδη δημοσιευθεί.

Abstract

In this thesis, industrially applicable extraction processes were studied in relation to the recovery of high-value bioactive compounds from microalgae. Specifically, extracts of astaxanthin and other carotenoids were recovered from dry biomass derived from the alga *Haematococcus pluvialis* as well as extracts of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and other omega-3-fatty acids were recovered from dry biomass derived from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the algae *Chlorella Vulgaris*.

The aim of this research is to study the extraction processes and optimize their parameters in order to maximize the recovery of the above substances. Subsequently, the extracts obtained from the optimal extraction process were incorporated into soft drink and juice products as well as in bakery preparations. The addition of extracts rich in bioactive compounds derived from the algae *Haematococcus pluvialis* and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* in juice products results in the development of natural products with increased nutritional value and improved quality characteristics.

In particular, the use of extracts from the alga *Haematococcus pluvialis* results in the natural enhancement of the color of the products due to the presence of carotenoids, as well as the extension of their shelf-life due to the antioxidant and antimicrobial activity of the extracts. Moreover, the incorporation of extracts from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* results in extending the shelf life of the products and increasing their nutritional value. As a result, the addition of the above extracts promotes the replacement of widely used synthetic additives such as butylated hydroxytoluene (BHT) or butylhydroxyanisole (BHA) which, in recent years, have been considered suspected carcinogens.

The dry biomass from the algae *Haematococcus pluvialis* was provided by Algatechnologies Ltd (Israel). All solvents used in the extractions were of analytical grade while the solvents used in the analyses were of HPLC grade. Acetone, petroleum ether, methanol, butylmethyl ether, water, anhydrous sodium sulfate salt, phosphoric acid were purchased by the company Fisher scientific, UK. The cholinesterase enzyme and the astaxanthin and trans-beta-apo-8'-carotenal standards were purchased by Sigma–Aldrich (USA). The MCT and orange oil were received by ASPIS S.A. Before extraction, the microalgae were dried in order to avoid microbial spoilage and preserve their organic content. Recovery was carried out through conventional extraction techniques with standard organic solvents as well as new and environmental friendlier ones such as citrus essential oils, while new methods utilizing microwaves or ultrasound were also deployed.

The use of microwave and ultrasound was found to enhance the recovery efficiency of bioactive compounds even when using greener/milder solvents. The efficiency of the

extractions was examined by calculating their yields, while the selectivity of the processes was evaluated using spectrophotometric protocols and high-performance liquid chromatography analyses.

Also, in another process, oil extract from the algae *Cholera Vulgaris* was used as a substitute for animal fat at a rate of 100% for the production of Brioche type pastry with excellent results. The dry biomass *Cholera Vulgaris* was obtained by Mega Foods and was used as raw material for the extraction of the bioactive oil. Following an ultrasonically assisted isopropanol extraction technique at conditions T=45°C, P=400 watts, F=25 kHz, the fat fraction was recovered. It was then discolored with activated charcoal and homogenized for analysis of the type of Omega-3 fatty acids and prepared for application to dough for bakery product type Brioche.

Proteins were aqueously extracted from the same algae and then recovered by centrifugation and purified by filtration. They were stabilized by freeze-drying so that they could be used as a powder to replace the egg, which is the classic source of protein in this recipe. The protein content in the extract was then determined and the method was evaluated. Subsequently, the final stage was the application of fat and protein substitutes in the Brioche bakery recipe and the organoleptic assessment of the product with objective acceptance criteria. The results were positive, giving equal or better organoleptic elements to the product with a prominent effect on increasing the shelf life of the product. This paper has already been published. Finally, utilizing the experience of different extraction methods, a comparative study is made between them and we present the relevant results. A relevant paper has been also published.

Κατάλογος Δημοσιεύσεων

Δημοσιεύσεις

M. Chronis, V.M. Christopoulou, S. Papadaki, M. Stramarkou, M. Krokida, "Optimization of Mild Extraction Methods for the Efficient Recovery of Astaxanthin, a Strong Food Antioxidant Carotenoid from Microalgae", Chem. Eng. Trans., 2021, doi: 10.3303/cet2187026

M. Stramarkou, S. Papadaki, K. Kyriakopoulou, I. Tzovenis, **M. Chronis**, M. Krokida, "Comparative Analysis of Different Drying Techniques Based on the Qualitative Characteristics of *Spirulina platensis* Biomass", Journal of Aquatic Food Product Technology, 2021, DOI: 10.1080/10498850.2021.1900969

M.S.G. Kafyra, S. Papadaki, **M. Chronis**, M. Krokida, "Microalgae based innovative animal fat and proteins replacers for application in functional baked products", Open Agriculture, 2018; 3: 427–436, <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0047>

Συμμετοχές σε Συνέδρια

M.Chronis K. Kyriakopoulou, S. Papadaki, M. Krokida, 5th International Symposium on delivery of Functionality in Complex Food Systems

K. Kyriakopoulou, A. Pappa, M. Krokida, A. Detsi, P. Kefalas, **M. Chronis** "Bioactive Compounds of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Berries and Leaves – Effects of Drying and Extraction Methods", ACTA Horticulture, Xth International Symposium, Maastricht, The Netherlands, 2012

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος και Ευχαριστίες.....	v
Σύνοψη	8
Περίληψη	9
Abstract	11
Κατάλογος Δημοσιεύσεων.....	14
Δημοσιεύσεις	14
Συμμετοχές σε Συνέδρια.....	14
Πίνακας Περιεχομένων.....	15
Κατάλογος Πινάκων	18
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	21
Κατάλογος Σχημάτων	23
Κατάλογος Εικόνων.....	24
Κίνητρα και πεδίο εφαρμογής της Διατριβής.....	26
Μέρος Α: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	30
Κεφάλαιο 1 : Αντιοξειδωτικές ενώσεις και εφαρμογές τους.....	31
1.1 Αντιοξειδωτικά και μηχανισμός προστασίας κατά των ριζών.....	31
1.2 Αντιοξειδωτικά στη βιομηχανία τροφίμων.....	33
1.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά και φυσικές χρωστικές	34
1.3.1 Τα καροτενοειδή από μικροφύκη ως πηγή αντιοξειδωτικών	36
Κεφάλαιο 2 : Ω3 λιπαρά οξέα και εφαρμογές τους.....	40
2.1 Τα Ω3 λιπαρά οξέα	40
2.2 Τα Ω3 λιπαρά οξέα στη βιομηχανία τροφίμων.....	44
2.3 Τα Ω3 λιπαρά οξέα ως πηγή ενέργειας (από φύκη και μικροφύκη).....	48
Κεφάλαιο 3: Λειτουργικά τρόφιμα και Βιοενεργές ενώσεις από θαλάσσιες πηγές	51
3.1 Λειτουργικά Τρόφιμα	51
3.2 Τα μικροφύκη ως πηγή Βιοδραστικών Ουσιών.....	53
3.3 Τα μικροφύκη ως πηγή Λιπαρών Οξέων (Ωμέγα 3).....	62
3.4 Τα μικροφύκη ως πηγή Φυσικών Αντιοξειδωτικών και Χρωστικών	63
Κεφάλαιο 4: Μέθοδοι Παραλαβής των Βιοδραστικών Ουσιών από Μικροφύκη.....	71
4.1 Επισκόπηση των μεθόδων εκχύλισης και παραλαβής βιοδραστικών ουσιών από μικροφύκη.....	71

4.2	Συμβατικές και Μη-Συμβατικές Μέθοδοι Εκχύλισης	74
4.3	Σύγχρονες Μη-Συμβατικές Μέθοδοι Εκχύλισης Βιοδραστικών Ουσιών	76
4.3.1	Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού (EYY)	76
4.3.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE)	79
4.3.3	Εκχύλιση υπό πίεση-υγρού (Pressurized-Liquid Extraction, PLE)	84
4.3.4	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Ένζυμα (Enzyme-Assisted Extraction, EAE)	87
4.3.5	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)	90
Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού των Βιοδραστικών Ουσιών από Μικροφύκη		98
5.1	Επισκόπηση των μεθόδων προσδιορισμού βιοδραστικών ουσιών από μικροφύκη	98
ΜΕΡΟΣ Β: Πειραματικό Μέρος		103
Κεφάλαιο 6. Ανάκτηση (εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων και υπερήχων, υπερκρίσιμη εκχύλιση με χρήση CO ₂), χαρακτηρισμός-εξευγενισμός των ξανθινών και των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από επιλεγμένα μικροφύκη		104
6.1	Εκχυλίσματα ασταξανθίνης και καροτενοειδών από το φύκος <i>Haematococcus pluvialis</i>	106
6.1.1	Εκχύλιση παρουσία Υπερήχων, Μικροκυμάτων και συνδυασμού Υπερήχων και Μικροκυμάτων (EYM)	108
6.2	Υπερκρίσιμη εκχύλιση	120
6.2.1	Μεθοδολογία	120
6.2.2	Αποτελέσματα και συζήτηση	123
6.3	Εκχύλιση Ασταξανθίνης με μικρογαλακτώματα	125
6.3.1	Μεθοδολογία	125
6.3.2	Αποτελέσματα και συζήτηση	127
6.4	Εκχυλίσματα EPA, DHA και άλλων ω-3 λιπαρών οξέων από το διάτομο <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	130
6.4.1	Εκχύλιση παρουσία Υπερήχων, Μικροκυμάτων και συνδυασμού Υπερήχων και Μικροκυμάτων (EYM)	131
6.4.2	Υπερκρίσιμη εκχύλιση	138
6.5	Εκχύλιση με μικρογαλακτώματα	143
6.6	Η Ξήρανση: Προεπεξεργασία για την Εκχύλιση	143
6.6.1	Ξήρανση Βιόμαζα Μικροφυκών: Σκοπός και Τεχνικές	143
6.7	Ξήρανση με ψεκασμό	153

Κεφάλαιο 7: Μελέτη εφαρμογής των εκχυλισμάτων στη βιομηχανία τροφίμων.....	155
7.1 Τομείς Εμπορικών και Βιομηχανικών Εφαρμογών Μικροφυκών.....	155
7.2 Αντικατάσταση Ζωικών Λιπαρών και Πρωτεϊνών με Εκχυλίσματα Μικροαλγών.....	157
7.2.1 Μεθοδολογία.....	160
7.2.2 Συμπεράσματα	162
7.3 Προσθήκη Ω3 λιπαρών οξέων και ασταξανθίνης σε χυμούς φρούτων για τη δημιουργία λειτουργικών ροφημάτων	163
7.3.1 Μεθοδολογία.....	163
7.3.2 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	166
Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα, πρωτοτυπίες και προοπτικές έρευνας.....	171
8.1 Γενικά Συμπεράσματα Διατριβής	171
8.2 Προοπτικές Έρευνας.....	178
Βιβλιογραφία	181
Παραρτήματα	214
Παράρτημα 1 Μικροάλγη και χρήσιμα ιχνοστοιχεία και μέθοδοι εκχύλισης	215
Παράρτημα 2 Πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές των μικροαλγών σε λειτουργικές τροφές	220
Παράρτημα 3 Συνταγή Brioches και Οργανοληπτικά Μέτρα.....	223
Παράρτημα 4 Συνταγές Χυμών, Προδιαγραφές και Περιγραφή Διεργασιών.....	224
Παράρτημα 5 Εμπορικές Κατηγορίες Εφαρμογής Καροτενοειδών	238
Παράρτημα 6 Ανάλυση ακετονικού εκχυλίσματος με HPLC-Cad του <i>H. Pluvialis</i>	239
Παράρτημα 7 Εκχύλιση αναφοράς Ασταξανθίνης με ακετόνη	240
Παράρτημα 8 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου <i>H.pluvialis</i>	241
Παράρτημα 9 Συνολικά Καροτενοειδή σε εκχύλιση με διαφορετικούς διαλύτες και υπερήχους σε 648W και 450W του φύκου <i>H.pluvialis</i>	242
Παράρτημα 10 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου <i>H.pluvialis</i>	244
Παράρτημα 11 Λιπαρά Οξέα <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	245

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Μέγεθος παγκόσμιας αγοράς προϊόντων μικροφυκών για τα έτη 2010-2012 27	
Πίνακας 2. Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ALA	44
Πίνακας 3. Η εξέλιξη της ζήτησης Ω3 στην αγορά των ΗΠΑ	46
Πίνακας 4. Σύγκριση των μικροφυκών με άλλες πηγές για την παραγωγή biodiesel [81] 50	
Πίνακας 5. Βασικές Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από Μικροφύκη.....	56
Πίνακας 6. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος <i>Spirulina</i> [95]	58
Πίνακας 7. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος <i>Nostoc</i> [95]	59
Πίνακας 8. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος <i>Chlorella</i> [95]	60
Πίνακας 9. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος <i>Dunaliella</i> [95]	60
Πίνακας 10. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος <i>Phaeodactylum tricornutum</i> [461].....	61
Πίνακας 11. Εξέλιξη της Αγοράς Καροτενοειδών	64
Πίνακας 12. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των Σύγχρονων Μεθόδων Διάσπασης των Κυττάρων στη Βιοτεχνολογία των Μικροφυκών [285]..	72
Πίνακας 13. Χρωστικές που Εκχυλίζονται με MAE[285]	82
Πίνακας 14. Λιπαρά που Εκχυλίζονται με MAE για παραγωγή βιοντήζελ[285] ..	82
Πίνακας 15. Περιεκτικότητα σε λιπίδια (%) και σύνθεση λιπαρών οξέων (mg/g) έξι ειδών φυκών (ξηρό βάρος) (229/88).....	85
Πίνακας 16. Μέθοδοι και Συνθήκες Εκχύλισης του φύκου <i>Haematococcus pluvialis</i>	109
Πίνακας 17. Περιεχόμενη Ασταξανθίνη ως mg/kg ξηρής μάζας και ποσοστό ασταξανθίνης σε ολικά καροτενοειδή, (A) σε 648W και (B) σε 450W .	117
A	B.....
Πίνακας 18. Σύμβολα της στατιστικής ανάλυσης των ολικών καροτενοειδών του πίνακα. Τιμές που δεν έχουν τον ίδιο εκθέτη (ξεχωριστά για A και B) είναι σημαντικά διαφορετικές ($p < 0.05$).....	118
Πίνακας 19. Συγκέντρωση ασταξανθίνης ως προς 1 mL εκχυλίσματος μέσω εκχύλισης με υπερήχους προερχόμενο από αναλογίες βιομάζας :διαλύτη 1:10 και 1:5, στα 648 και 450 W με χρήση ακετόνης ως διαλύτη.....	119
Πίνακας 20. Παράμετροι σχεδιασμού υπερκρίσιμης εκχύλισης	122
Πίνακας 21. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην ανάκτηση ασταξανθίνης σε σταθερή αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5.....	127

Πίνακας 22.	Επίδραση της αναλογίας βιομάζας: διαλύτη στην ανάκτηση ασταξανθίνης σε σταθερό χρόνο εκχύλισης (10 min)	129
Πίνακας 23.	Συγκέντρωση ασταξανθίνης σε τρεις κύκλους εκχύλισης με μικρογαλακτώματα. Κάθε κύκλος πραγματοποιήθηκε σε αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5, σε χρόνο εκχύλισης 10 min.	129
Πίνακας 24.	Απόδοση σε τρεις κύκλους εκχύλισης με μικρογαλακτώματα. Κάθε κύκλος πραγματοποιήθηκε σε αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5, σε χρόνο εκχύλισης 10 min.	130
Πίνακας 25.	Προφίλ λιπαρών οξέων του διατόμου <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	138
Πίνακας 26.	Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του διατόμου <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	138
Πίνακας 27.	Παράμετροι σχεδιασμού υπερκρίσιμης εκχύλισης	139
Πίνακας 28.	Απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης συναρτήσει της πίεσης λειτουργίας και του χρόνου εκχύλισης	140
Πίνακας 29.	Σύσταση λιπαρών οξέων του διατόμου <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ως συνάρτηση των συνθηκών εκχύλισης (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων)	141
Πίνακας 30.	Φασματοσκοπικές ιδιότητες, συγκέντρωση των σημαντικότερων καροτενοειδών (εκφραζόμενα σε mg /g ξηρών στερεών) σε αιθανολικά εκχυλίσματα <i>Spirulina Platensis</i> (SP), υγρής, ατμοσφαιρικά αποξηραμένης, λυοφιλωμένης, ξηρανθείσας υπό κενό στους 30°C, ξηρανθείσας υπό κενό στους 50°C και επιταχυνόμενα ηλιακά αποξηραμένης βιομάζας. Τα δεδομένα ελήφθησαν από το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Ανίχνευση: 480 nm. Στήλη 30 μm, Διαλύτες: μεθανόλη, t-βουτυλομεθυλαιθέρας και υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 1%. Ρυθμός ροής: 1 mL/min	152
Πίνακας 31.	Συγκέντρωση φυκοκυανίνης (εκφραζόμενη σε εκατοστιαία αναλογία επί ξηρού), ολικής φαινολικής περιεκτικότητας [εκφραζόμενης σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE)/(g ξηρών στερεών)] και αντιοξειδωτικής δράσης (εκφραζόμενης σε εκατοστιαία αναλογία επί ξηρού) στη <i>Spirulina platensis</i> , υγρή, ατμοσφαιρικά αποξηραμένη, λυοφιλοποιημένη, αποξηραμένη υπό κενό στους 30°C, αποξηραμένη υπό κενό στους 50°C και επιταχυνόμενη ηλιακά αποξηραμένη βιομάζα.	152
Πίνακας 32.	Μελέτες για την ξήρανση βιομάζας μικροφυκών με τεχνολογία ξήρανσης με ψεκασμό [440]	153
Πίνακας 33.	Αναλογίες των λιπαρών του <i>Chlorella vulgaris</i> (Tokusoglu and Ünal 2003)	158
Πίνακας 34.	Περιεκτικότητα του <i>Chlorella vulgaris</i> σε βιοδραστικά συστατικά ..	161
Πίνακας 35.	Κρίσιμες Φυσικές και Χημικές Παράμετροι των Προϊόντων Χυμών χωρίς και με βιοδραστικά συστατικά.....	166

Πίνακας 36.	Κρίσιμες Φυσικές και Χημικές Παράμετροι των Προϊόντων Χυμών χωρίς και με βιοδραστικά συστατικά σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας και αποθήκευσης.....	167
Πίνακας 37.	Οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών προϊόντων.....	169
Πίνακας 38.	Χρόνος Ζωής και Συνθήκες Συντήρησης των Παραγόμενων Επιλεγμένων Προϊόντων.....	170
Πίνακας 39.	Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου <i>H.pluvialis</i>	244
Πίνακας 40.	Προφίλ Λιπαρών Οξέων <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	245
Πίνακας 41.	Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του διατόμου <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	246

Κατάλογος Διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 1. Βήματα της μεθοδολογίας της πειραματικής διαδικασίας..... 105
- Διάγραμμα 2. Συνολικά καροτενοειδή εκχυλισμάτων παρουσία υπερήχων (648 W), μικροκυμάτων (200 W) και συνδυασμού υπερήχων μικροκυμάτων με αναλογία βιομάζας :διαλύτη 1:100 (g/mL) με χρήση ακετόνης ως διαλύτη σε χρόνους εκχύλισης 5, 10, 15, 20, 30, 40 min σε H. Pluvialis. 113
- Διάγραμμα 3. Απόδοση εκχυλισμάτων σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη, σε ένταση υπερήχων 450, 648 W με χρήση ακετόνης ως διαλύτη. 114
- Διάγραμμα 4. Ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε καροτενοειδή σε g ολικών καροτενοειδών / g ξηρής βιομάζας (d.b.) σε A. 648 W και B. 450 W. .. 115
- Διάγραμμα 5. Επίδραση της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη (Α), της πίεσης (Β) και της θερμοκρασίας (Γ) στην απόδοση της ασταξανθίνης από το φύκος *Haematococcus pluvialis*. Για την παράμετρο της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη, οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας ορίστηκαν σε 400 bar και 65 °C, αντίστοιχα. Για την παράμετρο της πίεσης, η περιεκτικότητα του συνδιαλύτη και η θερμοκρασία ορίστηκαν σε 2.0 mL/g και 65 °C, αντίστοιχα. Για την παράμετρο της θερμοκρασίας, η περιεκτικότητα του συνδιαλύτη και η πίεση ορίστηκαν σε 2.0 mL/g και 400 bar, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($p < 0.05$). 124
- Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση Ασταξανθίνης (% w/w) στο μικρογαλάκτωμα εκχύλισης 128
- Διάγραμμα 7. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1mL εκχυλίσματος σε διάφορους χρόνους εκχύλισης παρουσία υπερήχων και σε αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:10 στα 100W. 134
- Διάγραμμα 8. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1mL εκχυλίσματος σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας:διαλύτη (1:10, 1:5), με ένταση υπερήχων 100W και χρήση μεθανόλης, αιθανόλης, ελαίου πορτοκαλιού και MCT ως διαλύτες..... 135
- Διάγραμμα 9. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1 mL εκχυλίσματος σε αναλογία βιομάζας :διαλύτη 1:10 παρουσία υπερήχων (αριστερά) και μικροκυμάτων (δεξιά) με χρήση μεθανόλης και ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτες..... 136
- Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA) ως προς 1 mL εκχυλίσματος σε αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:10 παρουσία υπερήχων (αριστερά) και μικροκυμάτων (δεξιά) με χρήση μεθανόλης και ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτες..... 136

Διάγραμμα 11. Ανάλυση HPLC ακετονικού εκχυλίσματος <i>H. Pluvialis</i>	239
Διάγραμμα 12. Διάγραμμα ακετονικά εκχυλίσματα αναφοράς για ασταξανθίνη	240
Διάγραμμα 13. Συνολικά καρτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20) στα 648 W. 242	
Διάγραμμα 14. Διάγραμμα: Συνολικά καρτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20) στα 450 W.....	242
Διάγραμμα 15. Συνολικά καρτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) στα 648 W.....	243
Διάγραμμα 16. Ασταξανθίνη ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) στα 648 W	243

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.	Βασικές χημικές δομές αντιοξειδωτικών (πηγή: Pokorny, 2007)[18]	32
Σχήμα 2.	Μηχανισμός ελευθέρων ριζών	33
Σχήμα 3.	Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού EYY (Αναπαράχθηκε από τον García-Pérez et al. [188], με άδεια του Elsevier)	79
Σχήμα 4.	Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού MAE (a: προσανατολισμένης ακτινοβολίας b: πολυλειτουργικής ακτινοβολίας)	83
Σχήμα 5.	Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού PLE και των συνθηκών εργασίας.	87
Σχήμα 6.	Απλοποιημένο Διάγραμμα Ροής της Ενζυματικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από μικροάλγη	90
Σχήμα 7.	(A) Το ηχητικό φάσμα: ηχητικό φάσμα (20 Hz–20 kHz), φάσμα υπερήχων (20 kHz–10 MHz) και φάσμα μικροκυμάτων (>10 MHz). (B) Κύκλος ανάπτυξης φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της ακουστικής σπηλαίωσης. Αποσυμπίεση και συμπίεση. Ένας κύκλος υπερήχων διατηρεί τη φάση διαστολής συμπίεσης. Στη φάση αποσυμπίεσης, το αέριο διαχέεται σε φυσαλίδα επειδή η εξωτερική πίεση (P_o) είναι υψηλότερη από την εσωτερική πίεση (P_i). Ωστόσο, το αέριο διαχέεται εκτός της φυσαλίδας κατά τη διάρκεια της φάσης συμπίεσης λόγω εσωτερικής πίεσης είναι υψηλότερη από την εξωτερική πίεση.....	92
Σχήμα 8.	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους	94
Σχήμα 9.	Η Επίδραση των Υπερήχων σε Κυτταρικό Επίπεδο	95
Σχήμα 10.	Μέθοδοι ξήρανσης βιόμαζας μικροφυκών	146
Σχήμα 11.	Μικροφύκη: από την συγκομιδή στην κατανάλωση.....	156

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Χημικός Τύπος Εικοσαπενταενοϊκού οξέος	41
Εικόνα 2. Τρισδιάστατη Μορφής του EPA.....	41
Εικόνα 3. Χημικός Τύπος του Εικοσιδιεξανοϊκού οξέος.....	42
Εικόνα 4. Τρισδιάστατη Μορφή του DHA	42
Εικόνα 5. Χημική δομή του Άλφα-λινολενικού οξέος.....	43
Εικόνα 6. Τρισδιάστατη Απεικόνιση του ALA.....	43
Εικόνα 7. Η βιομάζα φυκών και μικροφυκών ως παραγωγική πηγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η ποικιλομορφία των βιοδραστικών ουσιών που παράγονται στο θαλάσσιο περιβάλλον και οι δυνητικές οδοί εφαρμογής τους [169].....	55
Εικόνα 8. Μικροφύκος <i>Spirulina sp</i>	57
Εικόνα 9. Μικροφύκος <i>Nostoc sp</i>	57
Εικόνα 10. Μικροφύκος <i>Chlorella sp</i>	59
Εικόνα 11. Μικροφύκος <i>Dunaliella sp</i>	60
Εικόνα 12. Μικροφύκος <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	61
Εικόνα 13. Εκχύλιση φύκους <i>Haematococcus pluvialis</i> παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων	109
Εικόνα 14. Διάταξη υπερκρίσιμης εκχύλισης	121
Εικόνα 15. Εκχυλίσματα του διάτομου <i>Phaeodactylum tricornutum</i> μέσω εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους	132
Εικόνα 16. Παρατηρήσεις στερεοσκοπικής και οπτικής μικροσκοπίας σε μη επεξεργασμένη (a), ατμοσφαιρικά αποξηραμένη (b), λυοφιλωμένη (c), αποξηραμένη υπό κενό στους 30°C (d), αποξηραμένη υπό κενό στους 50°C (e) και επιταχυνόμενη ηλιακά αποξηραμένη (f) Βιομάζα <i>Spirulina platensis</i> (SP).....	148
Εικόνα 17. Υγρά χρωματογραφήματα υψηλής πίεσης (HPLC) a) υγρής, b) αποξηραμένης με ατμοσφαιρική πίεση, c) λυοφιλωμένης, d) ξήρανσης υπό κενό στους 30°C, e) ξήρανσης υπό κενό στους 50°C και f) αποξηραμένης στον ήλιο βιομάζας <i>Spirulina platensis</i> (SP). Ανίχνευση: 480 nm. Στήλη 30 μm, Διαλύτες: μεθανόλη, t-βουτυλομεθυλαιθέρας και υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 1%. Ρυθμός ροής: 1 mL/min. Ταυτότητες κορυφής: 1: ζεαξανθίνη, 2: ξανθοφίλη, 3: β-καροτένιο, 4: κρυπτοξανθίνη. g) φάσματα HPLC-UV-DAD των χρωματογραφικών κορυφών για τη βιομάζα SP (οι	

αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κορυφών του σχήματος 3 a-d, f).

151

Εικόνα 18. Σύνθεση του <i>Chlorella vulgaris</i> (Tokuşoglu and Ünal 2003)	158
Εικόνα 19. Παραγόμενο τελικό μπριός μετά την ολική αντικατάσταση ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών.....	161
Εικόνα 20. Αποτελέσματα οργανοληπτικών δοκιμών γεύσης	162
Εικόνα 21. Αποτελέσματα οργανοληπτικών δοκιμών υφής και εμφάνισης	162
Εικόνα 22. Τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν, αναλύθηκαν και ακολούθησαν τεχνητή γήρανση και ελέγχθηκαν ως προς την μεταβολή του χρώματος	167

Κίνητρα και πεδίο εφαρμογής της Διατριβής

Η έρευνα για την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών από φυτά, φύκη και μικροφύκη ως άλλη πηγή αντιοξειδωτικών και βελτιωτικών στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων προέκυψε ως ανάγκη των σύγχρονων καταναλωτών. Επικεντρωνόμαστε στην αριστοποίηση των μεθόδων εκχύλισης και απομόνωσης των εν λόγω ουσιών από οικονομικές, επαρκείς και διαθέσιμες πηγές καθώς αναζητούμε πέρα από την καλύτερη τεχνικοοικονομική λύση και αυτή που συνάδει με τις αρχές της βιώσιμης ανάπτυξης. Επιπλέον εστιάζουμε στην παραγωγή προϊόντων που μπορούν να ενσωματωθούν σε τελικά εμπορικά προϊόντα με εφικτές στη βιομηχανία τεχνολογίες.

Έχοντας ήδη την πίεση των καταναλωτών αλλά και της νομοθεσίας, οι βιομηχανίες τροφίμων, ζωοτροφών και καλλυντικών θέλουν άμεσα να αντικαταστήσουν όλα τα συνθετικά συστατικά πετροχημικής προέλευσης με δυνητικά επικίνδυνες για την υγεία. Τα κυριότερα από αυτά έχουν στόχο τη βελτίωση του χρώματος αλλά και την αντιοξειδωτική προστασία των τελικών προϊόντων όπως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) ή βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA), ύποπτα καρκινογόνα (Namiki 1990) και τα τεχνητά χρώματα, όπως το λαμπρό κυανό FCF (E133), η ταρτραζίνη (E102), το πράσινο S (E142), το κίτρινο Sunset FCF (E110), η ερυθροσίνη (E127) και το ερυθρό (E129), τα οποία χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε προϊόντα διατροφής που απευθύνονται σε παιδιά και η νομοθεσία τα έχει ήδη περιορίσει καθώς υπάρχουν υποψίες ότι είναι πιθανοί παράγοντες διαταραχής συμπεριφοράς, αλλεργιών και καρκίνου (Socaciu 2008, Gultekin & Dofuc 2012, Weiss 2012, Nigg et al. 2012, Randhawa et al. 2009) [1, 2, 3, 4, 5].

Στην παρούσα έρευνα, εκχυλίσματα ασταξανθίνης και άλλων καροτενοειδών ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το φύκος *Haematococcus pluvialis* καθώς επίσης και εκχυλίσματα εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA), εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) ωμέγα-3- αλλά και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης: παρουσία υπερήχων, παρουσία μικροκυμάτων, παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων, με

μικρογαλακτώματα, με υπερκρίσιμο υγρό σε διάφορες συνθήκες και αξιολογούνται τα αποτελέσματά τους.

Στη συνέχεια, κάποια από τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη βέλτιστη διεργασία εκχύλισης ενσωματώθηκαν σε προϊόντα γαλακτωμάτων για την άμεση εφαρμογή τους στη βιομηχανία αναψυκτικών και χυμών. Συγκεκριμένα, η χρήση εκχυλισμάτων από το φύκος *Haematococcus pluvialis* έχει ως αποτέλεσμα τη φυσική ενίσχυση του χρώματος των προϊόντων λόγω της παρουσίας των καροτενοειδών, καθώς επίσης και την επέκταση της διατηρησιμότητας των προϊόντων λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων. Εξάλλου, η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση του χρόνου ζωής των προϊόντων και την αύξηση της διατροφικής τους αξίας κάτι που διακαώς αποζητά η βιομηχανία [11, 12, 13, 14, 15].

Η ανάγκη για την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών από μικροάλγη φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 1 όπως παρουσιάστηκε στο συνέδριο της DOF το 2013 και παραμένει ως φαίνεται στην παρούσα μελέτη ως σήμερα εξαιρετικά επίκαιρη.

Πίνακας 1. Μέγεθος παγκόσμιας αγοράς προϊόντων μικροφυκών για τα έτη 2010-2012¹

Product group	Product	Retail Value (US \$x10 ⁶)	Development
Multi-functional substances (colorants-antioxidants)	Astaxanthin	>200	Growing
	B-carotene	>350	Fast growing
	Lutein	>50	Growing
	Phycocyanin	10	Stagnant
	Phycoerythrin	>2	Stagnant

Επίσης, έγινε εκχύλιση πρωτεϊνών και λιπαρών από το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* με σκοπό την πλήρη υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών στην συνταγή

¹ M.Chronis et-al, 5th International Symposium on delivery of Functionality in Complex Food Systems

ενός αρτοσκευάσματος τύπου μπριός (Brioche). Κατόπιν έγιναν οργανοληπτικές δοκιμές του τελικού προϊόντος για την αποδοχή του από δοκιμαστές.

Τα βασικά λοιπόν κίνητρα ήταν τρία:

- η αλλαγές στη νομοθεσία
- η νέες καταναλωτικές τάσεις
- η ανάγκη για προϊόντα με πιο φιλικές διεργασίες για το περιβάλλον και η βιώσιμη ανάπτυξη

Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι μια πληθώρα πληροφοριών είναι διαθέσιμη σχετικά με φυσικά απαντώμενα βιοδραστικές ενώσεις με φαρμακευτικό δυναμικό ως αντιμικροβιακό, αντικαρκινικό, αντιμυκητιασικό μέσο, κ.ά. που μπορούν να παραχθούν από μικροφύκη [369]. Ωστόσο, πολλές κριτικές περιλαμβάνουν το προφίλ διανομής, την απόσταση ασφαλείας, την εκμετάλλευση *in vivo*, τις διεργασίες εκχύλισης βάσει GCE, και τις ανησυχίες σχετικά με την απόδοση να παραμένουν αναπάντητες και να πρέπει να αντιμετωπιστούν σε τρέχουσες και μελλοντικές μελέτες.

Παρά τις τρέχουσες βιοτεχνολογικές εξελίξεις, τους προαναφερθέντες προβληματισμούς, με ιδιαίτερη αναφορά στις μεθόδους εκχύλισης, οι βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από τη θάλασσα βρίσκονται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Ως εκ τούτου, εκτεταμένη επιστημονική έρευνα με αποδεδειγμένη δυνατότητα εκμετάλλευσης μετά από ένα ιστορικό ενασχόλησης είναι πολύ απαραίτητη σε αυτό το συγκεκριμένο σημείο ορόσημο της σχετικής έρευνας [7, 8, 9,10].

Επίσης, πολλά άλλα ερωτήματα εκκρεμούν ακόμη, και έτσι θέτουν ένα μεγάλο ερευνητικό κενό που πρέπει να αντιμετωπιστεί συνολικά:

- (1) Υπάρχει κάποιος σημαντικός περιορισμός για να κριθεί η ορθή χρήση των θαλάσσιων και των υδάτινων πηγών;
- (2) Υπάρχουν αρνητικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα που υπόκεινται στην εκμετάλλευση και εφαρμογή θαλάσσιες πηγές; Ή μήπως συνεισφέρουν θετικά σε μια πιο πράσινη οικονομία;
- (3) Υπάρχει κάποια προσέγγιση για τον περιορισμό της χαρακτηριστικής διασποράς και τη σταθεροποίηση της βιοδραστικότητας; κατά τη διάρκεια της εκχύλισης;

(4) Υπάρχει κάποια τακτική ή προσέγγιση για τον περιορισμό της διακύμανσης της απόδοσης και της σταθερότητας όταν εξάγεται ένα συστατικό από ίδιες ή διαφορετικές θαλάσσιες ή υδατικές πηγές;

(5) Υπάρχει κάποιος τρόπος επίλυσης του μεγέθους των σωματιδίων και της εξαρτώμενης από τη σύνθεση αποτελεσματικότητας του εκχυλιζόμενου δείγματος;

(6) Έχει καταλήξει η επιστημονική κοινότητα στις πλέον ενδεδειγμένες, αποδοτικές και φιλικές στο περιβάλλον τεχνικές εκμετάλλευσης μικροφυκών;

Τέτοιες ερωτήσεις αποτελούν ερευνητικούς μοχλούς και θέτουν στόχους για το μέλλον αλλά αποτελούν και αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Μέρος Α: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

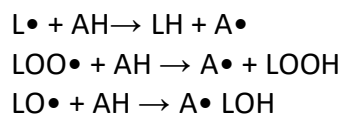
Κεφάλαιο 1 : Αντιοξειδωτικές ενώσεις και εφαρμογές τους

1.1 Αντιοξειδωτικά και μηχανισμός προστασίας κατά των ριζών

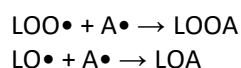
Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται ουσίες και ενώσεις τέτοιες που σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με ένα οξειδωτικό υπόστρωμα μπορούν να καθυστερήσουν ή να εξουδετερώσουν την οξειδωτική του δράση. Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές ομάδες, πρωτογενή (αυτά που σταματούν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης) και δευτερογενή (αυτά που την προλαμβάνουν) [16]. Κατηγοριοποιώντας τα αντιοξειδωτικά όμως με ένα πιο λεπτομερή τρόπο όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης τους, αυτά μπορεί να ομαδοποιηθούν σε:

- Αναστολείς αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (αναστέλλοντας τον σχηματισμό ριζών λιπιδίων)
- Αναστολείς που διακόπτουν το πολλαπλασιαστικό βήμα της αυτό-οξείδωσης
- Καταστολείς μονοατομικού οξυγόνου
- Συνεργικά αντιοξειδωτικά (τα οποία δεν δείχνουν καμία αντιοξειδωτική δράση όταν χρησιμοποιούνται μόνα τους, αλλά αυξάνουν την δραστικότητα ενός πρωτογενούς αντιοξειδωτικού όταν χρησιμοποιούνται μαζί με αυτό)
- Μειωτικοί παράγοντες (ο οποίοι μετατρέπουν τα υδροϋπεροξειδία σε σταθερές μορφές) και
- Μεταλλικές χηλικές ενώσεις (οι οποίες μετατρέπουν τα μεταλλικά ιόντα σε σταθερές μορφές) (Pokorný, 2007) [17]

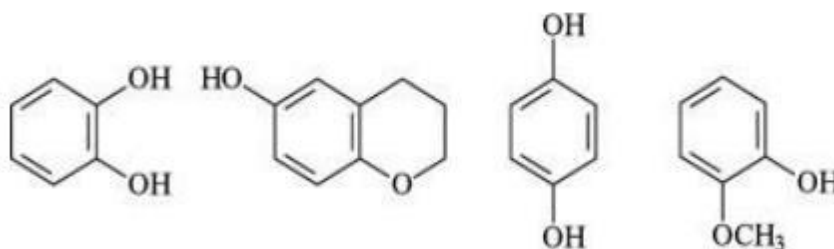
Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να απενεργοποιούν ρίζες με δύο κύριους μηχανισμούς: το μηχανισμό μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) και το μηχανισμό μεταφοράς μονήρων ηλεκτρονίων (Single Electron Transfer, SET). Τα αντιοξειδωτικά που λειτουργούν με μηχανισμό HAT απλά δωρίζουν ένα άτομο υδρογόνου για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, ενώ εκείνα που λειτουργούν με το μηχανισμό SET χρησιμοποιούν ένα ηλεκτρόνιο για να μειωθεί η δράση οποιαδήποτε ουσίας όπως μεταλλικά ιόντα, ρίζες και καρβονύλια, όπως φαίνεται στις παρακάτω εξισώσεις [16]:



Τα αντιοξειδωτικά που λειτουργούν με τον μηχανισμό HAT, όταν υπάρχουν σε ίχνη, μπορούν καθυστερήσουν ή να αποτρέψουν το βήμα έναρξης της αντίδρασης οξείδωσης ή να αναστείλουν άμεσα το στάδιο πολλαπλασιασμού της αντίδρασης με peroxy ή akoxyl ρίζες δίνοντας άμεσα το υδρογόνου τους.



Οι αντιοξειδωτικές ελεύθερες ρίζες αλληλοεπιδρούν με την αλυσίδα διάδοσης της αντίδρασης και σχηματίζουν ομάδες peroxy-αντιοξειδωτικές λόγω του υδροξυλίου τους.

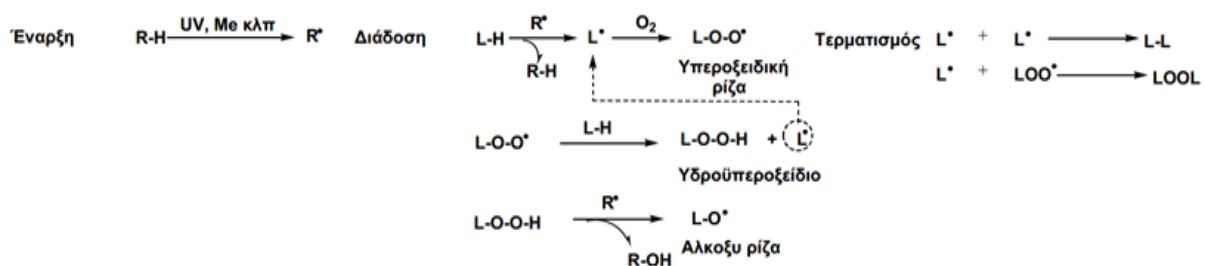


Σχήμα 1. Βασικές χημικές δομές αντιοξειδωτικών (πηγή: Pokorny, 2007)[18]

Σύμφωνα με την Ballard (2008), ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό πρέπει:

- να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά το υπόστρωμα του μέσου αντίδρασης.
- να είναι σε θέση να επισκευαστεί εύκολα από το βιολογικό σύστημα, καθώς αν το αντιοξειδωτικό καταστρέφεται ανεπανόρθωτα σε κάθε επαφή με το οξειδωτικό, τότε το σύστημα θα φτάσει γρήγορα σε κορεσμό όπου δεν θα προσφέρει πλέον προστατευτική δράση.
- να είναι προσβάσιμο στο αντιδραστικό μέσο στο μικροπεριβάλλον, δηλαδή, το αντιοξειδωτικό θα πρέπει να βρίσκεται και να διατηρείται ενεργό στο ίδιο μικροπεριβάλλον με τις οξειδωτικές ρίζες.
- να είναι σχετικά αδρανές προς το υπόστρωμα. Τα προϊόντα δεν πρέπει να είναι τοξικά για το σύστημα και δεν πρέπει να λάβουν μέρος στην αντίδραση.

- να είναι καταλυτικά στο μηχανισμό απόσβεσης της αντίδρασης. Ιδανικά, τα αντιοξειδωτικά θα πρέπει να δημιουργούνται αφού έχει αντιδράσει το μέσο με την οξειδωτική ρίζα[18].



Σχήμα 2. Μηχανισμός ελευθέρων ριζών

1.2 Αντιοξειδωτικά στη βιομηχανία τροφίμων

Αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρόσθετα σε χυμούς, σκευάσματα φρούτων και λαχανικών, λίπη και έλαια, και σε πολλά επεξεργασμένα τρόφιμα, για να αποφευχθεί ή να επιβραδυνθεί η οξειδωτική φθορά τους. Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί σήμερα μία ποικιλία φυσικών και συνθετικών αντιοξειδωτικών συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών (κυρίως C, E), των καροτενοειδών (β-καροτένιο, ασταξανθίνη κ.α) για εφαρμογές σε χυμούς, ροφήματα και σκευάσματα φρούτων και λαχανικών αλλά και των βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), τριτ-βουτυλο υδροκινόνη (TBHQ) και γαλλικός προπυλεστέρας (PG), για την πρόληψη της οξειδωτικής υποβάθμισης των λιπιδίων. Οι ενώσεις αυτές, προστίθενται τόσο στα προϊόντα φρούτων όσο και σε έλαια και λίπη σε χαμηλές συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 50 έως 250 ppm για την πρόληψη σχηματισμού των υπεροξειδίων κατά την αποθήκευση [19].

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια υπήρξαν πολλές συζητήσεις σχετικά με τις ανεπιθύμητες δράσεις που παρουσιάστηκαν εξαιτίας της χρήσης τέτοιων συνθετικών αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχτεί ότι η χρήση του BHT σε ζωοτροφές προκάλεσε εσωτερικές αιμορραγίες σε ζωικά όργανα όπως το πάγκρεας και μείωσε σημαντικά τους παράγοντες πήξης στο αίμα αρουραίων (Umemura et al., 2001; Ito et

al., 1984), ενώ η ΒΗΑ από την άλλη πλευρά, έχει κατηγορηθεί για την πρόκληση δυσπλασιών και το σχηματισμό αλλοιώσεων στο πεπτικό σύστημα αρουραίων [20, 21, 22]. Γι' αυτό το λόγο, παρόλο που τα συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, υπάρχει μια γενική τάση να μειωθεί η χρήση τους, λόγω της αυξανόμενης ανησυχίας του καταναλωτικού κοινού σχετικά με τα χημικά πρόσθετα.

Συνεπώς, προκύπτει ισχυρή ανάγκη για την αποτελεσματική απομόνωση ισάξιων αντιοξειδωτικών ενώσεων από φυσικές πηγές, όπως είναι τα φυτοχημικά στοιχεία των μικροφυκών αλλά και τα αιθέρια έλαια που μπορούν να απομονωθούν μέσω εκχύλισης φυτών και να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές των συνθετικών αντιοξειδωτικών [23]. Αν και το σύνολο των συνθετικών αντιοξειδωτικών είχαν και έχουν υποβληθεί σε ελέγχους ως προς την τοξικολογική συμπεριφορά τους, ορισμένα από αυτά παρουσιάστηκαν ως ύποπτα για βλαβερές επιπτώσεις στον οργανισμό μετά από μια μακρά περίοδο χρήσης. Στη σημερινή εποχή υπάρχουν πολλές μελέτες σε φυσικά αντιοξειδωτικά προϊόντα που εκτός από επαρκή παρουσιάζονται να είναι υγιεινότερα και ασφαλέστερα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά και από τη δεκαετία του 1980 έχουν προταθεί ως μια καλή εναλλακτική λύση.

1.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά και φυσικές χρωστικές

Είναι γεγονός ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες που προέρχονται από μικροφύκη, φύκη, φυτά και γεωργικά προϊόντα συνήθως θεωρούνται και είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (GRAS). Με αυτό το δεδομένο τόσο η βιομηχανία τροφίμων όσο όλο και περισσότεροι καταναλωτές προτιμούν να χρησιμοποιούνται φυτοχημικά για να αντικαταστήσουν συνθετικά πρόσθετα σε προϊόντα διατροφής. Αυτό αποτελεί πλέον και ένα εργαλείο μάρκετινγκ και προώθησης καθώς ολοένα και περισσότερα τρόφιμα με την ένδειξη "όλα φυσικά" ή "χωρίς τεχνητά συστατικά" γίνονται εκτός από αποδεκτά όλο και πιο δημοφιλή στις αγορές. Εκτός από την ετικέτα που αποτελεί σημαντικό σημείο του «marketing» ενός προϊόντος, οι μελέτες που έχουν γίνει κατά καιρούς σε φρούτα, φύκη, μικροφύκη και λαχανικά έχουν αποδείξει ότι οι προστατευτικές δράσεις τους οφείλονται σε συστατικά όπως οι πολυφαινόλες, οι βιταμίνες, τα καροτενοειδή και τα μέταλλα που είναι πολλαπλώς χρήσιμα σε μια υγιεινή διατροφή. Με αυτό το σκεπτικό, η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων για την αναστολή των αντιδράσεων οξείδωσης των ελευθέρων ριζών κερδίζει συνεχώς έδαφος

στην βιομηχανία τροφίμων και γίνεται ιδιαίτερα ελκυστική σε μια μεγάλη μερίδα καταναλωτών.

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι μια διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά έχει πολλαπλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, όπως τη μείωση των καρδιαγγειακών και στεφανιαίας νόσου (Khurana et al., 2013; Quiñones et al., 2013), του διαβήτη (Bahadoran et al., 2013), αντι-φλεγμονώδης δράση (Kim et al., 2013; Nichols & Katiyar, 2010), δράση κατά των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Queen & Tollefsbol, 2010; Weinreb, et al., 2004) και του καρκίνου (Ding et al., 2013; Fantini et al., 2015; Yang et al., 2009) [24-33]. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι δεν έχουν αναφερθεί ιδιαίτερες αρνητικές επιπτώσεις στην κατανάλωση πολυφαινολικών ενώσεων, κάποιες πολυφαινόλες μπορεί να γίνουν επιβλαβείς όταν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες. Οι πιο γνωστές αρνητικές ιδιότητες που τους αποδίδονται είναι η ικανότητα κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, ο σχηματισμός συμπλόκων με πολυσακχαρίτες, η επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων και η παρέμβαση στην βιοδιαθεσιμότητα των μεταλλικών ιόντων [34, 35].

Τα αντιοξειδωτικά είναι μια κατηγορία ενώσεων που είναι σε θέση να αντιμετωπίζουν οξειδωτικό στρες και να βελτιώνουν σημαντικά την ανθρώπινη υγεία, κερδίζοντας τεράστια προσοχή από την Κοινότητα της βιοϊατρικής έρευνας. Το ανθρώπινο σώμα έχει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση των επιπτώσεων των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες, βασισμένο σε ενζυματικά και μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά μόρια [36]. Εκτός από αυτόν τον μηχανισμό άμυνας του ανθρώπινου σώματος, υπάρχουν αρκετά εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια ζωικής ή φυτικής προέλευσης, που εισάγονται κυρίως από τη διατροφή. Τα πιο κοινά φυτά, φρούτα, λαχανικά και βότανα στη διατροφή περιέχουν αντιοξειδωτικά και περιλαμβάνουν μορφές, όπως βιταμίνη E, λουτεΐνη, βιταμίνη C, β-καροτένιο, φλαβονοειδή και λυκοπένιο [37, 38].

Τα αντιοξειδωτικά εκείνα που προέρχονται από τρόφιμα μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά τα ίδια απευθείας σε ζώντα οργανισμό, καθώς και να επιφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία μέσω άλλων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της δράσης τους ως επαγωγείς των μηχανισμών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα, τη μακροζωία, τη συντήρηση των κυττάρων και την επιδιόρθωση του DNA [39]. Τα καροτενοειδή αποτελούν μια σημαντική ομάδα αντιοξειδωτικών που την τελευταία δεκαετία χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα ως πρόσθετα όχι μόνο λόγω

των αποδεδειγμένων οφελών για την υγεία κυρίως από την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση αλλά και λόγω της θετικής τους επίδρασης στο χρώμα, τη μικροδομή και τις ρεολογικές ιδιότητες των προϊόντων διατροφής [37, 38].

1.3.1 Τα καροτενοειδή από μικροφύκη ως πηγή αντιοξειδωτικών

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα καροτενοειδή έχουν προστατευτικά αποτελέσματα έναντι ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι φλεγμονώδεις νόσοι, το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης, η διαβητική νεφροπάθεια, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις και οι οφθαλμικές παθήσεις [40, 41]. Τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτικές απαιτήσεις για υψηλής ποιότητας προϊόντα διατροφής μαζί με τη χρήση φυσικών συστατικών αυξάνονται συνεχώς και ως εκ τούτου τα φυσικά καροτενοειδή προσφέρονται να αντικαθιστούν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, κυρίως σε προϊόντα που προορίζονται για συχνή κατανάλωση από τον άνθρωπο [42, 286, 370, 371].

Η ασταξανθίνη (3,30-διωδροξυ-bb-καροτίνη-440-διόνη) είναι ένα ξανθοφυλλικό καροτενοειδές με ανώτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, 38 φορές υψηλότερη από το β-καροτένιο και 500 φορές υψηλότερη από τη βιταμίνη E [43, 44]. Μπορεί να συντεθεί μέσω της αντίδρασης Wittig από δύο άλατα C15-φωσφονίου με C10 διαλδεύδη [6, 45] καθώς μπορεί και να εξαχθεί από διάφορες φυσικές πηγές. Οι γαρίδες, ο σολομός, τα άλγη, η μαγιά, η πέστροφα, το κριλ, οι καραβίδες και πολλά μικροφύκη είναι μερικές ομάδες ζωντανών οργανισμών που βιοσυνθέτουν την ασταξανθίνη [46].

Ωστόσο, η περιεκτικότητα ασταξανθίνης είναι χαμηλή και σχεδόν περιορισμένη στα είδη ψαριών (καρκινοειδή και σολομοειδή) που απαντάται δημιουργώντας έτσι τις συνθήκες που καθιστούν τα θαλάσσια φύκη και κυρίως τα μικροφύκη ως τις σημαντικότερες πηγές ασταξανθίνης. Η ασταξανθίνη βρίσκεται συνήθως στη φύση είτε συζευγμένη με πρωτεΐνες είτε εστεροποιημένη με ένα ή δύο λιπαρά οξέα (μορφές μονοεστέρα και διεστέρα) [47]. Η ασταξανθίνη έχει σήμερα αυξημένη δημοτικότητα λόγω των οφελών της στην υγεία, δηλαδή της αντιοξειδωτικής δράσης, των αντικαρκινικών επιδράσεων, και των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της στην ανθρώπινη υγεία αλλά και άλλων εφαρμογών στο διατροφολόγιο ιχθυοκαλλιεργειών [455, 456]. Δεδομένου ότι δεν συντίθεται από τον άνθρωπο, χρειάζεται μια δίαιτα πλούσια σε ασταξανθίνη για να μπορέσει κανείς να αποκομίσει όλα αυτά τα οφέλη που προσφέρει [6, 45].

Η ασταξανθίνη στο κύτταρο του μικροφύκου βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά ενισχύει την υπεράσπισή της από το οξειδωτικό στρες με την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών [42]. Σε εμπορική βάση, η ασταξανθίνη προέρχεται και παράγεται είτε από μικροφύκη *Haematococcus pluvialis*, είτε από τον ζυμομύκητα *Xanthophyllomyces dendrorhous* (επίσης αποκαλούμενη *Phaffia rhodozyma*), είτε από το βακτήριο *Paracoccus carotinifaciens* ή και μέσω χημικής σύνθεσης. Η τρέχουσα κύρια φυσική πηγή ασταξανθίνης είναι τα μικροφύκη *Haematococcus pluvialis*. Η μορφή της παραγόμενης ασταξανθίνης *Haematococcus pluvialis* έχει χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον σε ανθρώπινα διατροφικά συμπληρώματα και αποτελεί επίσης τη μορφή στην οποία έχουν διεξαχθεί όλες οι ανθρώπινες κλινικές δοκιμές [Industry Experts, 2015]. Το *Haematococcus pluvialis* περιέχει υψηλές ποσότητες ασταξανθίνης που μπορούν να φτάσουν σε συγκέντρωση ακόμη και περισσότερο από 4% ξηρού βάρους [46].

Το πράσινο φύκος *Haematococcus pluvialis* είναι ένα είδος χλωροφύτων γλυκού νερού της οικογένειας *Chlorophyta*, που φυσικά βρίσκεται σε εύκρατες ζώνες σε όλο τον κόσμο, αναπτύσσεται σε μικρούς λοβούς γλυκού νερού, και είναι σε θέση να αναπτυχθεί τόσο ως φωτοτροφικά όσο και ως ετεροτροφικά άλγη [48, 44]. Σύμφωνα με τη φυσιολογία του, το *Haematococcus pluvialis*, κατά τη διάρκεια δυσμενών συνθηκών ανάπτυξης, ξεκινά καροτενογένεση και συσσώρευση λιπιδίων, ενώ υποβάλλεται σε μορφολογική μετατροπή από πράσινα φυτικά κύτταρα σε βαθύ κόκκινο σχηματίζοντας βαθιές κόκκινες κύστες [49, 50].

Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή το *Haematococcus pluvialis* περιέχει λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και μέταλλα [51]. Για το λόγο αυτό, το *H. pluvialis* προσελκύει μεγάλο ενδιαφέρον από τον επιστημονικό και βιομηχανικό τομέα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως ζωντανό εργοστάσιο για βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από φυσικές πηγές. Ως εκ τούτου, οι επιστήμονες προσπαθούν να βελτιστοποιήσουν το σύστημα καλλιέργειας και εκμετάλλευσης προκειμένου να επιτευχθεί η υψηλότερη συγκέντρωση ασταξανθίνης μέσα στις κόκκινες κύστες του [52].

Οι παράγοντες στρες που οδηγούν το *H. pluvialis* στην καροτενογένεση είναι κυρίως ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών και υπερβολική έκθεση στο φως, αζωτοπενία, ενώ παράγοντες, όπως η αλατότητα, φαίνεται να μην προκαλούν αυτή τη βιοχημική

διαδικασία [48]. Μάλιστα ο Li et al., 2011 για να αναδείξει τη δυναμική καλλιέργεια αναφέρει χαρακτηριστικά ότι σε διάρκεια ενός χρόνου, περίπου 900 κιλά ασταξανθίνης παρήχθησαν σε βιομηχανική κλίμακα από 32 τόνους βιομάζας [53].

Προκειμένου να εκμεταλλευτούμε τις λειτουργικές ιδιότητες των μικροφυκών, οι βιοενεργές ενώσεις πρέπει να ανακτηθούν από τη βιομάζα των μικροφυκών, χρησιμοποιώντας αποτελεσματικές μεθόδους. Η ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων βασίζεται κυρίως στη χρήση συμβατικών τεχνικών ανάκτησης, όπως η μηχανική διέγερση, η τεχνική πιεσμένου υγρού και η εκχύλιση Soxhlet, που προτιμώνται λόγω του χαμηλού κόστους επεξεργασίας και της λειτουργικής ευκολίας.

Παρά τα πλεονεκτήματά τους, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν τοξικούς διαλύτες, απαιτούν ένα επιπλέον βήμα εξάτμισης για ανάκτηση και συνήθως χρειάζονται μεγάλες ποσότητες διαλύτη και παρατεταμένο χρόνο. Επιπλέον, η πιθανότητα θερμικής αποικοδόμησης των βιοδραστικών ενώσεων δεν μπορεί να αγνοηθεί, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια των μεγάλων χρόνων εκχύλισης [54]. Ως εκ τούτου, στην πρόσφατη βιβλιογραφία βλέπουμε να προτείνεται η υπερκρίσιμη εκχύλιση CO₂ για την αποτελεσματική ανάκτηση της ασταξανθίνης. Αλλά και αυτή η τεχνική είναι πολύ δαπανηρή στη χρήση με εκτεταμένο κόστος εγκατάστασης, λειτουργίας και συντήρησης, θέτοντας σημαντικές δυσκολίες στην επεκτασιμότητά της [55].

Προσφάτως, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εφαρμογή αποτελεσματικών, φιλικών προς το περιβάλλον, καθαρών, επεκτάσιμων και χαμηλού κόστους τεχνικών εκχύλισης, όπως η εκχύλιση με υπερήχους που πληροί τα παραπάνω και μπορεί να φτάσει σε υψηλές αποδόσεις εκχύλισης σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική λύση για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων [56]. Η αρχή της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης βασίζεται στην αύξηση της μεταφοράς μάζας μεταξύ του διαλύτη και της βιομάζας βελτιώνοντας τη διάχυση μέσω της αποτελεσματικής κατάρρευσης της κυτταρικής μεμβράνης [57]. Μέσω της αποτελεσματικής διείδυσης διαλύτη αποφεύγεται η εκτεταμένη χρήση διαλύτη μαζί με την ανάγκη εφαρμογής σε υψηλή θερμοκρασία. Η εκχύλιση υπερήχων εφαρμόζεται ευρέως για την αποτελεσματική ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από ένα ευρύ φάσμα φυτικών υλικών, φυκιών και μικροφυκών [42].

Επιπλέον, οι αυξανόμενοι νομοθετικοί περιορισμοί στην παρουσία οργανικών διαλυτών στα τρόφιμα σε συνδυασμό με τις αρνητικές επιπτώσεις τους στις θρεπτικές και λειτουργικές ιδιότητες των ενώσεων, έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση «πιο πράσινων» εναλλακτικών λύσεων από τους οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την εξαγωγή πολύτιμων λιπόφιλων ενώσεων από μικροφύκη [58, 59]. Μεταξύ αυτών, το λιμονένιο και τα τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας (έλαιο MCT) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση οργανικών διαλυτών. Το λιμονένιο είναι ένα απλό συμπλήρωμα διατροφής που περιέχει ένα φυσικό κυκλικό μονοτερπένιο και είναι ένα σημαντικό συστατικό του ελαίου που εξάγεται από φλούδες εσπεριδοειδών με πιθανές χημειοπροληπτικές και αντικαρκινικές δραστηριότητες [60, 61]. Το έλαιο MCT είναι μια μοναδική μορφή διαιτητικού λίπους που προσδίδει ένα ευρύ φάσμα θετικών οφελών για την υγεία. Τα διαιτητικά λίπη είναι μόρια που αποτελούνται από μεμονωμένα άτομα άνθρακα που συνδέονται σε αλυσίδες που κυμαίνονται από 2 έως 22 άτομα άνθρακα σε μήκος. Τα MCT, αποτελούνται από 6 έως 10 συνδέσμους άνθρακα και λόγω του μικρότερου μήκους της αλυσίδας τους, έχουν μια σειρά από μοναδικές ιδιότητες [62].

Εκτός από όλα αυτά τα πλεονεκτήματα που δείχνουν το λιμονένιο και το MCT ως εναλλακτικό σύστημα διαλυτών για πράσινη εκχύλιση, τα εκχυλίσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε τρόφιμα, χωρίς να αφαιρεθεί ο διαλύτης. Επιπλέον, οι ευαίσθητες βιοδραστικές ενώσεις, όπως η ασταξανθίνη, προστατεύονται και διατηρούνται επειδή δεν υπάρχει η διαδικασία του σταδίου απομάκρυνσης του διαλύτη που μπορεί να αλλάξει την αντιοξειδωτική τους δράση και σταθερότητα [63, 64].

Τέτοιες πράσινες τεχνικές εκχύλισης, ως η υποβοηθούμενη με υπερήχους, σε συνδυασμό με την αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών με φυσικούς, απαντούν σε ένα σημαντικό ζήτημα στην επεξεργασία τροφίμων. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η βελτιστοποίηση της των πράσινων μεθόδων εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων, χρησιμοποιώντας πράσινους διαλύτες όπως τα τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας (MCT) και το λιμονένιο [372].

Κεφάλαιο 2 : Ω3 λιπαρά οξέα και εφαρμογές τους

2.1 Τα Ω3 λιπαρά οξέα

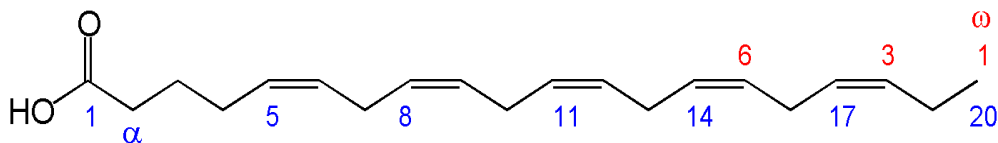
Το ανθρώπινο σώμα μπορεί να παράξει τα περισσότερα από τα είδη των λιπών που χρειάζεται από άλλα λίπη ή πρώτες ύλες. Αυτό δεν συμβαίνει όμως για ωμέγα-3 λιπαρά οξέα (που ονομάζονται επίσης και n-3 λίπη). Αυτά είναι απαραίτητα λιπαρά και ο οργανισμός μας πρέπει να τα πάρει από την τροφή. Τρόφιμα πλούσια σε ωμέγα-3 είναι τα ψάρια, τα άγλη και μικροάγλη, φυτικά έλαια, ξηροί καρποί (ειδικά καρύδια), σπόροι λιναριού, λινέλαιο, και μερικά φυλλώδη λαχανικά.

Αυτό που κάνει όμως τα ωμέγα-3 λιπαρά ξεχωριστά είναι το ότι αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των κυτταρικών μεμβρανών σε όλο το σώμα και επηρεάζουν τη λειτουργία των κυτταρικών υποδοχέων σε αυτές τις μεμβράνες. Παρέχουν το σημείο εκκίνησης για την παραγωγή ορμονών που ρυθμίζουν την πήξη του αίματος, τη συστολή και χαλάρωση των τοιχωμάτων των αρτηριών, και την αντιμετώπιση φλεγμονής. Συνδέονται επίσης με τους υποδοχείς των κυττάρων που ρυθμίζουν τη γενετική τους λειτουργία. Πιθανό να οφείλεται στις παραπάνω επιδράσεις, ότι τα ωμέγα-3 λιπαρά έχουν αποδειχθεί να βοηθούν στην πρόληψη καρδιακών παθήσεων και εγκεφαλικών επεισοδίων, να μπορούν να βοηθούν στον έλεγχο του λύκου, του εκζέματος, και της ρευματοειδής αρθρίτιδας, και να μπορούν να διαδραματίζουν προστατευτικούς ρόλους στον καρκίνο και σε άλλες φλεγμονώδεις συνθήκες.

Τα Ωμέγα-3 λιπαρά είναι μια βασική οικογένεια των πολυακόρεστων λιπαρών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι, αλλά οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται στο εικοσαπεντανοϊκό οξύ EPA, στο εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ DHA, και στο άλφα-λινολενικό οξύ (ALA):

- Εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA): Το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA, επίσης εικοσαπενταενοϊκό οξύ) είναι ένα ωμέγα-3 λιπαρό οξύ. Στη βιβλιογραφία, δίνεται το όνομα 20:5 (n-3). Έχει επίσης το και το μη συστηματικό όνομα ως τιμνοδονικό οξύ. Στη χημική δομή, EPA είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με μια αλυσίδα 20 ανθράκων και πέντε cis διπλών δεσμών. Ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα από το τέλος του ωμέγα (σχηματική δομή).

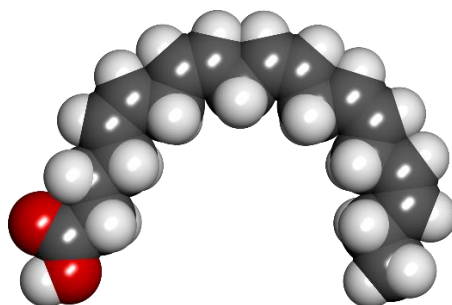
Εικόνα 1. Χημικός Τύπος Εικοσαπενταενοϊκού οξέος



Το EPA είναι τόσο πρόδρομος όσο και το προϊόν υδρολυτικής διάσπασης του εικοσαπενταενολικού αιθυλεναμιδίου (EPEA: $C_{22}H_{35}NO_2$; 20:5,n-3). Αν και οι μελέτες των συμπληρωμάτων ιχθυελαίου, που περιέχουν τόσο DHA όσο και EPA, έχουν αποτύχει να υποστηρίξουν τους ισχυρισμούς της πρόληψης των καρδιακών προσβολών ή και εμβολών, μια πρόσφατη πολυετή μελέτη της Vascepa (αιθυλ-εικοσαπεντανοϊκό οξύ), ένα συνταγογραφούμενο φάρμακο που περιέχει μόνο EPA, αποδείχθηκε ότι μπορεί να μειώσει τα καρδιακά εμφράγματα, την ανακοπή καρδιάς και τον καρδιαγγειακό θάνατο κατά 25% σε σχέση με ένα εικονικό φάρμακο σε εκείνους με ανθεκτική σε στατίνες υπερτριγλυκεριδαιμία [86].

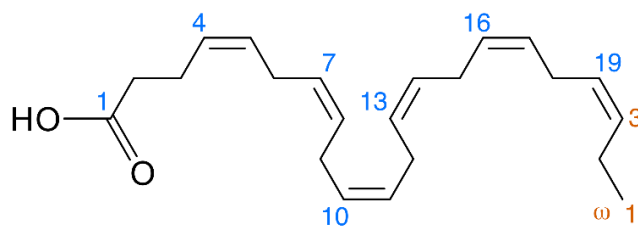
Το EPA προέρχεται κυρίως από ψάρια, άλγη και μικροάλγη και εξ αυτού ονομάζονται μερικές φορές θαλάσσιο ωμέγα-3 (π.χ. εμπορικά, από μικροφύκη όπως *monodus subterraneus*, *Chlorella minutissima* και *Phaeodactylum tricornutum*, που αναπτύσσονται ως εμπορική πηγή) [84, 85].

Εικόνα 2. Τρισδιάστατη Μορφή του EPA



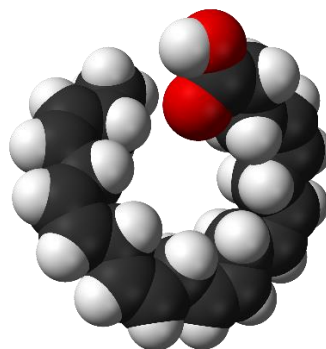
- **Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA):** Το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA) είναι ένα ωμέγα-3 λιπαρό οξύ που είναι ένα κύριο δομικό συστατικό του ανθρώπινου εγκεφάλου, του εγκεφαλικού φλοιού, του δέρματος και του αμφιβληστροειδούς. Στη βιβλιογραφία δίνεται το όνομα 22:6 (n-3). Μπορεί να συντεθεί από άλφα-λινολενικό οξύ ή να ληφθεί απευθείας από το μητρικό γάλα από ιχθυέλαιο ή από άλγη [65]. Η δομή του DHA είναι ένα καρβοξυλικό οξύ (-οϊκό οξύ) με αλυσίδα 22 ανθράκων (docosa- προέρχεται από τα Αρχαία Ελληνικά για 22) και έξι cis διπλούς δεσμούς με τον πρώτο διπλό δεσμό που βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα από το τέλος της ωμέγα δομής [66, 67]. Το μη συστηματικό όνομά του είναι ceronic οξύ, ενώ το συστηματικό όνομά του είναι all-cis-εικοσι-4,7,10,13,16,19-εξα-ενοϊκό οξύ και το σύντομο όνομά του είναι 22:6 (n-3) στην ονοματολογία των λιπαρών οξέων.

Εικόνα 3. Χημικός Τύπος του Εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος



Με μεγαλύτερη συχνότητα το DHA απαντάται στα ψάρια και τους πολυκυτταρικούς οργανισμούς με πρόσβαση σε ωκεάνια τρόφιμα ψυχρού νερού και προέρχεται από φωτοσυνθετικά και ετερότροφα μικροφύκη και η συγκέντρωσή του αυξάνεται σε οργανισμούς όσο υψηλότερα βρίσκονται στην τροφική αλυσίδα.

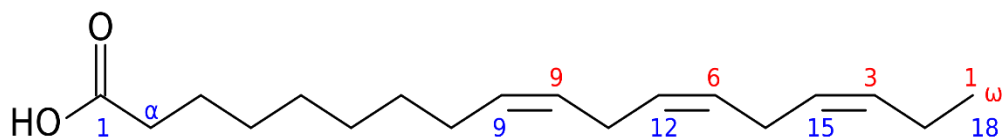
Εικόνα 4. Τρισδιάστατη Μορφή του DHA



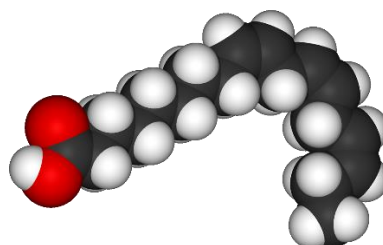
Το DHA παράγεται επίσης εμπορικά από μικροφύκη όπως το *Cryptocodinium cohnii* και ένα άλλο του γένους *Schizochytrium* [68]. Το DHA που παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας τα μικροφύκη είναι επίσης κατάλληλο για χορτοφάγους που αποτελούν σημαντική νέα τάση καταναλωτών (Vegeterian, Vegan) [69].

- Άλφα-λινολενικό οξύ (ALA), το πιο κοινό ωμέγα-3 λιπαρό οξύ στις περισσότερες δυτικές δίαιτες, βρίσκεται σε φυτικά έλαια και ξηρούς καρπούς (ειδικά καρύδια), σπόρους λιναριού και λινέλαιο, φυλλώδη λαχανικά, και μερικά ζωικά λίπη, ειδικά σε φυτοφάγα ζώα. Όσον αφορά τη δομή του, ονομάζεται όλα-cis-9,12,15-οκταδενιενικό οξύ [70, 458]. Στην επιστημονική βιβλιογραφία, παρατίθεται από τον αριθμό των λιπιδίων, 18:3 και (n-3). Είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με αλυσίδα 18 ανθράκων και τρεις διπλούς δεσμούς cis. Ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα από το άκρο του μεθυλίου της αλυσίδας λιπαρών οξέων, γνωστή ως n-end. Έτσι, το α-λινολενικό οξύ είναι ένα πολυακόρεστο n-3 α (ωμέγα-3) λιπαρό οξύ. Είναι ένα ισομερές του γ-λινολενικού οξέος (GLA), ένα λιπαρό οξύ 18:3 (nn-6) (δηλαδή, ένα πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ με τρεις διπλούς δεσμούς).

Εικόνα 5. Χημική δομή του Άλφα-λινολενικού οξέος



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη Απεικόνιση του ALA



Το ALA είναι γνωστό και ως μητρικό λιπαρό οξύ επειδή το ανθρώπινο σώμα το χρησιμοποιεί γενικά για την παραγωγή και αποθήκευση ενέργειας αλλά και για την παραγωγή EPA και DHA. Εντούτοις, η διαδικασία δεν είναι πολύ αποδοτική και συνεπώς είναι καλύτερο να προσλάβει κανείς και τα τρία Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα από τη διατροφή [71]. Επίσης υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι διατροφή πλούσια σε ωμέγα-3 και ιδιαίτερα σε ALA μπορεί να βοηθήσει στις επιπτώσεις της πανδημίας (Covid 19) και γενικότερα στην υγεία του οργανισμού μας καθώς ενισχύουν το ανοσοποιητικό μας σύστημα.

Οι επιστήμονες μέχρι σήμερα δεν έχουν καθορίσει την ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα πρόσληψης για όλα τα Ω3 λιπαρά οξέα παρά μόνο για το Άλφα-λινολενικό οξύ (ALA) που βρίσκουμε στο NIH το εθνικό ινστιτούτο υγείας των ΗΠΑ και παραθέτουμε στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2. Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ALA

Στάδιο Ανάπτυξης	Συνιστώμενη ποσότητα ALA
Γέννηση – 12μηνών	0,5γρ
Παιδιά 1-3 ετών	0,7γρ
Παιδιά 4-8 ετών	0,9γρ
Αγόρια 9- 13 ετών	1,2γρ
Κορίτσι 9-13 ετών	1,0γρ
Έφηβοι 14-18 ετών	1,6γρ
Κορασίδες 14-18 ετών	1,1γρ
Άνδρες	1,6γρ
Γυναίκες	1,1γρ
Εγκυμονούσες	1,4γρ
Θηλάζουσες μητέρες	1,3γρ

Πηγή: NIH, USA

2.2 Τα Ω3 λιπαρά οξέα στη βιομηχανία τροφίμων

Τα Ω3 λιπαρά οξέα έχουν ήδη αρχίσει να έχουν πολλές και ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Η διαρκής αναζήτηση για φυσικότερους τρόπους στην επίλυση σοβαρών νοσημάτων του σύγχρονου τρόπου ζωής όπως η αύξηση της χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων αποτελεί ένα πεδίο στο οποίο η βιομηχανία τροφίμων αλλά και

συμπληρωμάτων διατροφής έχει ήδη κάνει πολλά βήματα ενώ διαφαίνονται πολλές ακόμη προοπτικές.

Τα ισχυρότερα στοιχεία για την ευεργετική επίδραση των ωμέγα-3 λιπών έχουν να κάνουν με τις καρδιακές παθήσεις. Αυτά τα λιπαρά φαίνεται να βοηθούν τον καρδιακό παλμό να διατηρείται σταθερός και να μην παρεκκλίνει σε ένα επικίνδυνο ή δυνητικά θανατηφόρο ακανόνιστο ρυθμό. Τέτοιες αρρυθμίες προκαλούν τους περισσότερους από τους 500.000 και πλέον καρδιακούς θανάτους που συμβαίνουν κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τα Ωμέγα-3 λιπαρά μειώνουν επίσης την αρτηριακή πίεση και τον καρδιακό ρυθμό, συνδράμουν στη βελτίωση της λειτουργίας των αιμοφόρων αγγείων, και, σε υψηλότερες δόσεις, μειώνουν τα τριγλυκερίδια και μπορεί να περιορίζουν τις φλεγμονές που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [65, 72, 73, 74, 75].

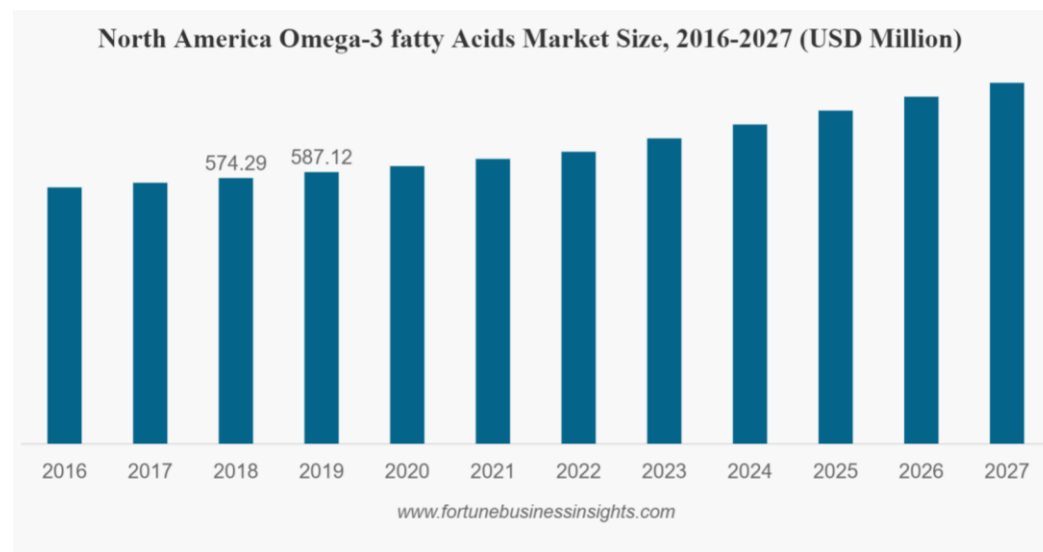
Αρκετές μεγάλες ερευνητικές δοκιμές έχουν αξιολογήσει την επίδραση των ψαριών ή των ιχθυελαίων στις καρδιακές παθήσεις. Στο Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio (γνωστή ως GISSI Prevention Trial), οι επιζώντες καρδιακής προσβολής που έλαβαν μια κάψουλα 1 γραμμαρίου ωμέγα-3 λιπαρών ουσιών κάθε μέρα για τρία χρόνια ήταν λιγότερο πιθανό να έχουν επαναλαμβανόμενη καρδιακή προσβολή, εγκεφαλικό επεισόδιο ή θάνατο από αιφνίδιο θάνατο από εκείνους που έλαβαν εικονικό φάρμακο [66]. Ειδικότερα, ο κίνδυνος αιφνίδιου καρδιακού θανάτου μειώθηκε κατά περίπου 50%. Στην πιο πρόσφατη μελέτη στην Ιαπωνία EPA Lipid Intervention Study (JELIS), οι συμμετέχοντες που έλαβαν EPA συν μια στατίνη για μείωση χοληστερόλης ήταν λιγότερο πιθανό να έχουν ένα σημαντικό στεφανιαίο επεισόδιο (αιφνίδιο καρδιακό επεισόδιο, θανατηφόρα ή μη θανατηφόρα καρδιακή προσβολή, ασταθή στηθάγχη, ή μια διαδικασία για να ανοίξει ή να παρακάμψει μια στένωση ή μπλοκάρει στεφανιαία αρτηρία) από εκείνους που έλαβαν μια στατίνη και μόνο [67].

Επίσης οι ερευνητές παρατηρούν προσεκτικά και ένα διαφορετικό είδος της ισορροπίας, αυτό μεταξύ των πιθανών επιπτώσεων των θαλάσσιων και των φυτικών ωμέγα-3 λιπαρά για τον καρκίνο του προστάτη. Τα αποτελέσματα από την Συνεχή Μελέτη Επαγγελματιών Υγείας και άλλοι δείχνουν ότι οι άνδρες των οποίων οι δίαιτες είναι πλούσιες σε EPA και DHA (κυρίως από τα ψάρια και τα θαλασσινά) είναι

λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν προχωρημένο καρκίνο του προστάτη από εκείνους με χαμηλή πρόσληψη EPA και DHA [72, 73].

Τα παραπάνω δεδομένα και η καταγεγραμμένη πλέον αύξηση της ζήτησης στην παγκόσμια αγορά έχουν ωθήσει τη βιομηχανία τόσο στην ολοκλήρωση των πλέον αποδοτικών όσο και οικολογικών μεθόδων παραγωγής και αξιοποίησης πηγών Ω3 λιπαρών οξέων. Η εξέλιξη της ζήτησης στην αγορά αποτυπώνεται και στον παρακάτω πίνακα 3 που δείχνει την εξέλιξή της στη Βόρεια Αμερική.

Πίνακας 3. Η εξέλιξη της ζήτησης Ω3 στην αγορά των ΗΠΑ



Έχουν επίσης αναφερθεί εφαρμογές των λιπαρών οξέων ως διατροφικά πρόσθετα στη δίαιτα των αθλητών με σκοπό τη διατήρηση της μυϊκής ισχύος μετά από επίπονη δραστηριότητα (Insenmann et al). Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι οι αθλητές που λάμβαναν πρόσθετο ALA είτε αύξησαν είτε διατήρησαν τη μυϊκή τους μάζα σε σχέση με εκείνους που λάμβαναν το εικονικό πρόσθετο μετά από έξι ημέρες εξαντλητικής αθλητικής δραστηριότητας [76].

Ένας από τους κύριους παράγοντες που υποστηρίζουν την αύξηση της αγοράς των Ωμέγα 3 λιπαρών οξέων είναι οι συνεχώς βελτιούμενες τεχνικές που βελτιώνουν τόσο τη διάθεση όσο και την απορρόφηση αυτών των ουσιών από το ανθρώπινο σώμα. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη προσθέτων με βάση τα λιπαρά οξέα παραμένει μία πρόκληση λόγω της απρόβλεπτης απορρόφησης αλλά και της βιοδιαθεσιμότητας.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ποικίλουν οι παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη των Ω3 λιπαρών οξέων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Είναι γεγονός ότι οι σημαντικότερες εταιρείες στην παγκόσμια αγορά έχουν επενδύσει τεράστια κεφάλαια για την ολοκλήρωση τεχνολογιών που θα βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των Ωμέγα 3 λιπαρών οξέων. Μάλιστα, πρόσφατα η Pharmako Biotechnologies λανσάρισε ένα νέο πρόσθετο φάρμακο, αυτό-γαλακτοποιήσιμο διάλυμα Ωμέγα 3 το οποίο έχει απορροφητικότητα έως έξι φορές περισσότερο από τα κλασικά πρόσθετα ιχθυέλαια.

Θα πρέπει ωστόσο να επισημάνουμε ότι η μεγαλύτερη πρόκληση για την επιπλέον ανάπτυξη της αγοράς παραμένει η οργανοληπτική αποδοχή των Ωμέγα 3 λιπαρών οξέων θαλάσσιας και γενικότερα υδατικής προέλευσης (ψάρια, άλγη και μικροάλγη). Είναι βέβαιο ότι οι μέθοδοι εκχύλισης έχουν εξελιχθεί πολύ τα τελευταία χρόνια αλλά παρόλα αυτά σε όλα τα εκχυλίσματα παραμένει μία οσμή και άρωμα ιχθύος που επηρεάζει το οργανοληπτικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, η διατηρησιμότητα των τελικών προϊόντων και ιδιαίτερα η αποφυγή της οποιασδήποτε οξειδωσης παραμένουν μια πρόκληση τόσο για τη βιομηχανία τροφίμων όσο και για την ερευνητική κοινότητα.

Ωστόσο, αν και υπάρχουν αρκετές προκλήσεις, τα τελευταία χρόνια βλέπουμε την ολοένα συνεχόμενη παραγωγή και προώθηση νέων προϊόντων με πρόσθετα Ωμέγα 3 και Ωμέγα 6 λιπαρά τόσο σε υγρά όσο και σε στερεά τρόφιμα. Η είσοδος των μεγάλων πολυεθνικών εταιρειών (Nestle, Unilever, Coca Cola κ.ά.) στον κλάδο έχει δώσει μία ώθηση στη ζήτηση, την εξέλιξη και την ανάπτυξη προϊόντων της κατηγορίας. Μάλιστα το 2020 παρουσιάστηκε μια μεγάλη αύξηση στην ανάπτυξη προϊόντων αυτής της κατηγορίας και κυρίως εκείνων που περιέχουν DHA και EPA που συνδέεται άμεσα με την προστασία της υγείας και τη θωράκιση του ανοσοποιητικού συστήματος που απέκτησαν ιδιαίτερη σημαντικότητα εξαιτίας της πανδημίας του κορωνοϊού Covid19.

Σημαντικά προϊόντα που συναντούμε στην παγκόσμια αγορά τροφίμων είναι τόσο τα αλειφόμενα προϊόντα με κυρίαρχο το co-brand Meg-3/Becel της Unilever με την Ocean Nutrition, το γάλα Omega Plus της Nestle όσο και τα πρόσφατα προϊόντα ροφήματα χυμών της Coca Cola όπως το Gomega ή εκείνα της Minute Maid με πρόσθετα Ωμέγα 3. Αυτό μας επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα προϊόντα έχουν ήδη αρχίσει να καθιερώνονται στη βιομηχανία τροφίμων αναζητώντας πάντα καλύτερες λύσεις

αναφορικά με τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά στη διάρκεια του χρόνου ζωής αλλά και της διαθεσιμότητας με μια διαδικασία που πρέπει να σέβεται τους κανόνες της βιωσιμότητας καθώς αυτοί έχουν πλέον τεθεί σε απόλυτη προτεραιότητα από το σύνολο του κλάδου.

Μάλιστα υπάρχει ήδη έρευνα από τις ίδιες τις εταιρείες με δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά (WAM Blom, et al) που αναδεικνύει ότι ο συνδυασμός Ωμέγα 3 και στερόλων σε απλές τροφές συνδέεται με τη μείωση των τριγλυκεριδίων από 9 - 16% καθώς και τη μείωση της LDL χοληστερόλης περίπου 13% [77].

2.3 Τα Ω3 λιπαρά οξέα ως πηγή ενέργειας (από φύκη και μικροφύκη)

Η ανάγκη για όλο και περισσότερη ενέργεια έχει αυξήσει τη ζήτηση ορυκτών καυσίμων άνθρακα, πετρελαίου και φυσικού αερίου από έτος σε έτος. Αυτό έχει δώσει κίνητρο στην ανάπτυξη, την επέκταση και την αξιοποίηση της βιομάζας από μη ορυκτά καύσιμα. Τέτοια προσπάθεια εξερεύνησης, ανάπτυξης, επεξεργασίας και αξιοποίησης βιομάζας από μη ορυκτά καύσιμα είναι η καλλιέργεια μικροφύκων που περιέχουν τριγλυκερίδια τα οποία μπορούν να εξαχθούν ως μεθυλεστέρες (βιοντήζελ). Η εκχύλιση ως παραγωγική διαδικασία πραγματοποιείται σε 5 στάδια, τα οποία είναι η συγκομιδή, η σταθεροποίηση, η μεθυλίωση, η εκχύλιση και ο εξευγενισμός. Το ποσό και η αναλογία κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι ένα κλειδί που καθορίζει την καταλληλότητα των μικροφύκων ως πρώτη ύλη βιοκαυσίμου. Έχουν ήδη ξεκινήσει να γίνονται πολλές μελέτες και έρευνες για την επιλογή του καταλληλότερου μικροφύκου για την παραγωγή βιοκαυσίμων [78, 79].

Πρόκειται για μια κατάλληλη τεχνολογική προσέγγιση με χαμηλό και αποδοτικό κόστος. Τα μικροάλγη έχουν προσελκύσει την προσοχή για την παραγωγή βιοενέργειας, επειδή μπορούν να παράγουν έλαια στα κύτταρα του σώματος χρησιμοποιώντας και την ηλιακή ενέργεια [327, 328]. Η περιεκτικότητα των ελαίων σε κάποια μικροφύκη κυμαίνεται από 20-50% σε ξηρή βάση [80]. Χρησιμοποιούνται διάφορα κριτήρια για την επιλογή των μικροφύκων ως κατάλληλης πρώτης ύλης για παραγωγή βιοκαυσίμων, καθώς κάθε είδος μικροφύκου παράγει διαφορετικές αναλογίες λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων.

Η χημική σύνθεση των μικροφυκών ως πηγής βιοκαυσίμων έχει μελετηθεί στο παρελθόν, για παράδειγμα το *Chorella protothecoides* έχει ποσοστό λιπιδίων (55%), πρωτεϊνών (10-52%) και υδατάνθρακες (10-15%). Το *Chorella vulgaris* έχει ποσοστά λιπιδίων (14-22 %), πρωτεΐνες (51-58 %) και υδατάνθρακες (12-17 %) [80]. Χρωματογραφική ανάλυση GC των λιπαρών εστέρων όξινης μεθίλης του επιλεγμένου στελέχους *Cynobacterial (Synechococcus sp. HS01)* που καλλιεργούνται σε εμπορική κλίμακα και συμπληρώνεται με λάδι στρουθοκαμήλου και έδειξε υψηλή περιεκτικότητα σε C16 (παλμιτολικό οξύ και παλμιτικό οξύ) και C18 (λινελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ και λινολενικό οξύ) λιπαρά οξέα 42,7 και 42,8 %, αντίστοιχα. Κάποια μικροάλγη μπορούν επίσης να συνθέσουν μια μεγάλη ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως C22:6 (42 %) στο *Aurantiochytrium sp.*, C22:5 + C22:6 (39.4 %) στο *Schizochytrium limacinum* και C20:5 (25 %) στο *Porphyridium cruentum* [82].

Ο πίνακας 4 συγκρίνει τις αποδόσεις ελαίου των μικροφύκων με άλλες πρώτες ύλες. Μπορεί να δει από τη σημαντική διαφορά στην παραγωγικότητα της βιομάζας, την απόδοση του πετρελαίου και την παραγωγικότητα του βιοντήζελ μικροφύκη και τις άλλες καλλιέργειες. Τα μικροφύκη έχουν υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας, απόδοση ελαίου και τελικά βιοντήζελ σε σύγκριση με άλλους ενώ ταυτόχρονα δεν εξαντλούν άλλους πόρους όπως δάση στην περίπτωση του φοινικελαίου ή καλλιεργήσιμη γη και τρόφιμα απαραίτητα για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών της ανθρωπότητας όπως το καλαμπόκι, η σόγια και άλλα δημητριακά ή ζαχαροκάλαμα.

Από τα παραπάνω προκύπτει συνεπώς άλλη μία πιθανή και εναλλακτική εφαρμογή των λιπαρών οξέων των μικροφυκών όχι για τρόφιμα αλλά για την παραγωγή ενέργειας [348, 350]. Αυτό μπορεί να αποτελέσει μια λύση για την αξιοποίηση της παραγωγής είτε συνεργατικά με άλλες εκμεταλλεύσεις, είτε για περιβαλλοντικούς σκοπούς όπως η δέσμευση CO₂ ή για να δώσει λύσεις σε υπερβάλλουσα παραγωγή σε συνθήκες μειωμένης ζήτησης των προϊόντων τροφίμων

Πίνακας 4. Σύγκριση των μικροφυκών με άλλες πηγές για την παραγωγή biodiesel [81]

Oil Feedstocks	Oil Content (% dry wt. biomass)	Oil yields (L oil/ha/year)	Land Use (sm/year/L biodiesel)	Biodiesel productivity (L biodiesel/ha/year)
Oil Seeds				
Microalgae (low oil content)	30	58.700	0	61.091
Microalgae (medium oil content)	50	97.800	0	101.782
Microalgae (high oil content)	70	136.900	0	142.475
Corn/Maize (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	56	179
Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	26	378
Soyabean (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	15	661
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	13	772
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	10	952
Canola/Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	10	1.014
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1.070	9	1.113
Caster (<i>Ricinus communis</i>)	48	1.307	8	1.360
Palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5.366	2	5.585

Κεφάλαιο 3: Λειτουργικά τρόφιμα και Βιοενεργές ενώσεις από θαλάσσιες πηγές

3.1 Λειτουργικά Τρόφιμα

Η εμφάνιση και η συχνότητα εμφάνισης διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η παχυσαρκία και ο διαβήτης μπορεί να σχετίζονται με την κατανάλωση δίαιτας υψηλής θερμιδικής αξίας σε συνδυασμό με καθιστική ζωή. Η έννοια των λειτουργικών τροφίμων εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία όπου θεωρήθηκε ως εργαλείο για την προώθηση της υγείας και της ευημερίας [86].

Μάλιστα πίσω στο 1992, η ιαπωνική κυβέρνηση καθιέρωσε μια πολιτική "Τρόφιμα ειδικών χρήσεων για την υγεία" (FOSHU). Μια ιδέα που αναπτύχθηκε περαιτέρω στην Ευρώπη στο πλαίσιο του σχεδίου «Λειτουργική Επιστήμη Τροφίμων στην Ευρώπη» (FUFOSE), το οποίο υποστηρίχτηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC) και από το Διεθνές Ινστιτούτο Επιστημών της Ζωής (ILSI). Στο τέλος αυτού του έργου παρατηρήθηκαν αρκετά ενδιαφέροντα σημεία (Bellisle et al., 1998, Diplock et al., 1999), που περιλάμβαναν έναν ορισμό μιας λειτουργικής τροφής ως "τρόφιμο το οποίο έχειδειχθεί ότι επηρεάζει θετικά μία ή περισσότερες φυσιολογικές λειτουργίες, ότι είναι σε θέση να αυξήσει την ευημερία ενός ανθρώπου ή/και να μειώσει τον κίνδυνο να υποστεί μια ασθένεια [87, 88]. Ο ορισμός αυτός συνεπάγεται ότι ένα λειτουργικό τρόφιμο πρέπει να διατηρεί το σχήμα του τροφίμου (εξαιρώντας έτσι τα χάπια και τις κάψουλες) και ότι η λειτουργική τροφή πρέπει να έχει φυσιολογική επίδραση μετά από κατανάλωση που υπερβαίνει και είναι πέρα από τις παρατηρούμενες θρεπτικές επιδράσεις.

Τα λειτουργικά τρόφιμα (functional food) είναι μια ομάδα προϊόντων που είναι περισσότερο τρόφιμα, αλλά λιγότερο φαρμακευτικά προϊόντα. Δυστυχώς, δεν υπάρχει ακόμη διεθνώς αποδεκτός ορισμός αυτών των προϊόντων, επομένως η κρίση τους ποικίλλει ανά χώρα. Στις περισσότερες χώρες τα λειτουργικά τρόφιμα λαμβάνονται ως μέρος της διατροφής ή ως μέρος των διαιτητικών συμπληρωμάτων. Η συχνότητα χρήσης των είναι στο 50%-70% στον πληθυσμό των ανεπτυγμένων χωρών και ο αριθμός αυτός αυξάνεται κατά την ηλικία² [89]. Οι γυναίκες χρησιμοποιούν περισσότερο τα λειτουργικά τρόφιμα από τους άνδρες. Από την άποψη της ασφάλειας

² stván G. Télessy, in The Role of Functional Food Security in Global Health, 2019

τα λειτουργικά τρόφιμα είναι αξιόπιστα ακόμη και αν δεν έχουν γιατί δεν απαιτούν έγκριση από αρχές όπως τα φαρμακευτικά. Σε πολλές πλέον κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, τα αποτελέσματα των δοκιμών υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά τους, καθώς και τη γενική ασφάλειά τους για την ανθρώπινη κατανάλωση. Παρόλα αυτά, τα λειτουργικά τρόφιμα μπορεί να ενέχουν έναν ορισμένο κίνδυνο εάν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν χωρίς ιατρικό έλεγχο σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπείες δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις με το φάρμακο μπορούν να είναι επιβλαβείς, ειδικά στους ευάλωτους (ηλικιωμένους, μικρά παιδιά, χρονίως ασθενείς) πληθυσμούς. Έτσι έχουμε ήδη παραδείγματα από παρασκευάσματα ιχθυελαίου, πρεβιοτικά, και προβιοτικά να αναθεωρούνται³[89].

Τα λειτουργικά τρόφιμα δεν θεραπεύουν ή προλαμβάνουν ασθένειες από μόνα τους και δεν είναι απαραίτητα για τη διατροφή. Τα λειτουργικά τρόφιμα πρέπει να θεωρούνται ένα σημαντικό στοιχείο στο πλαίσιο μιας υγιεινής διατροφής για να προσθέσουν το δικό τους ρόλο. Η ένταξή τους στη διατροφή μπορεί και πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια:

- Να ενσωματώνονται στη διατροφή, και να προσθέτουν οφέλη ανάλογα με την ατομική φυσιολογική κατάσταση (εγκυμοσύνη, γαλουχία, σωματική δραστηριότητα, κ.λπ.).
- Να καταναλώνονται λειτουργικά τρόφιμα σε περίπτωση αποκλεισμού ορισμένων τροφίμων από δυσανεξία (π.χ. ψάρια, ξηροί καρποί και γάλα), υπό βέλτιστες προσλήψεις (π.χ. λαχανικά και φρούτα) ή υπό χαμηλή πρόσληψη όταν έτσι απαιτείται (π.χ. γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα ή και ψάρια). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η συμπερίληψη των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων στα εμπλουτισμένα τρόφιμα, εμπλουτισμένο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα με ασβέστιο ή βιταμίνες, ή προβιοτικά θα μπορούσε να βοηθήσει να καλυφθούν ιδιαίτερες ατομικές διατροφικές απαιτήσεις.
- Σε χρόνιες ασθένειες (οστεοπόρωση, καρδιαγγειακή νόσο, παχυσαρκία, διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο κ.λπ.), η ανάγκη ορισμένων θρεπτικών συστατικών μπορεί να

³ stván G. Télessy, in The Role of Functional Food Security in Global Health, 2019

αυξηθεί, και ορισμένες βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται σε λειτουργικά τρόφιμα θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία.

- Μια επιπλέον προσέγγιση θα αναφερόταν στον προληπτικό ή ενισχυτικό ρόλο των λειτουργικών τροφίμων στην υγεία που, όταν περιλαμβάνονται σε μια υγιεινή διατροφή, θα μπορούσαν να βοηθήσουν ώστε να πλησιάσουμε τη βέλτιστη διατροφή. Ωστόσο, αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας με τη χρήση καλά ελεγχόμενης μεθοδολογίας⁴ [90].

Ο πλέον συνηθισμένος από τους τρόπους που χρησιμοποιούνται συχνότερα από τους παραγωγούς τροφίμων για την παραγωγή σύνθετων λειτουργικών τροφίμων είναι η προσθήκη ενός ή περισσότερων ενδιάμεσων βιοδραστικών ενώσεων σε ένα παραδοσιακό φαγητό. Οι προστεθείσες βιοδραστικές ενώσεις συνήθως αναφέρονται ως λειτουργικά συστατικά και είναι υπεύθυνες για τις λειτουργικές βιοδραστικότητες που μπορεί να παρουσιάσει το νέο προϊόν. Χρησιμοποιώντας αυτή τη στρατηγική, αρκετά λειτουργικά τρόφιμα έχουν ήδη αναπτυχθεί και εμπορευματοποιηθεί με ποικίλες εφαρμογές όπως για παράδειγμα, προϊόντα που υποστηρίζουν μεταξύ άλλων την αντιυπερτασική δράση, τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τα πρεβιοτικά αποτελέσματα ή τις ρυθμιστικές επιδράσεις στην όρεξη.

3.2 Τα μικροφύκη ως πηγή Βιοδραστικών Ουσιών

Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τη διερεύνηση των προϊόντων μεταβολισμού των μικροφυκών όχι μόνο για την κατανόηση της φύσης τους αλλά και για την αναζήτηση ουσιών με πιθανές εφαρμογές στον άνθρωπο και μάλιστα σε διαφορετικούς τομείς ενδιαφέροντος [325, 341, 344]. Ο έλεγχος των εκχυλισμάτων ή η απομόνωση των μεταβολιτών από διαφορετικά μικροφύκη είναι μια κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιολογικής δραστηριότητας αυτών των συστατικών. Τα μικροφύκη ως έχουμε ήδη αναφέρει έχουν περιγραφεί ως πλούσιες πηγές διαφόρων ενεργών συστατικών εμπορικού ενδιαφέροντος [91, 92, 95, 96].

Η παγκόσμια αξία της αγοράς των μικροφυκών εκτιμάται ότι είναι περίπου 6,5δισ Δολάρια ΗΠΑ από τα οποία τα \$2,5δισ παράγονται από τον τομέα της υγιεινής

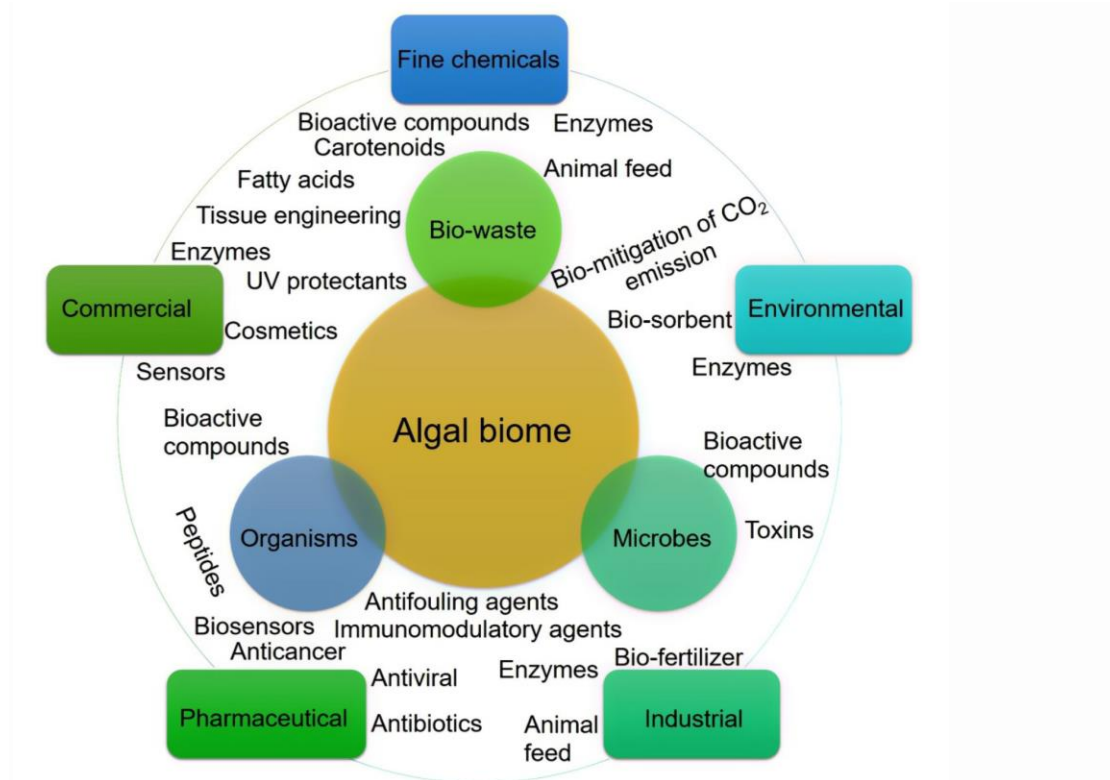
⁴ J.A. Tur, M.M. Bibiloni, in Encyclopedia of Food and Health, 2016

διατροφής, \$1,5δισ από την παραγωγή DHA και τα υπόλοιπα από άλλα παράγωγα. Η συνολική παραγωγή είναι περίπου 7,5εκ τόνους και βαίνει αυξανόμενη [91, 93, 94].

Οι βιοδραστικές ενώσεις μικροαλγικής προέλευσης μπορούν να προέλθουν απευθείας από τον πρωτογενή μεταβολισμό, όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και χρωστικές ουσίες ή μπορούν να συντεθούν από δευτερογενή μεταβολισμό. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να παρουσιάσουν αντιμυκητιασικές, αντιυικές, αντιαλγικές, αντιενζυματικές ή αντιβιοτικές δράσεις [96, 97, 305].

Επίσης, πολλές από τις παραγόμενες ενώσεις (κυανοβίνη, ελαϊκό οξύ, λινολενικό οξύ, παλμιτολεϊκό οξύ, βιταμίνη E, B12, β-καροτένιο, φυκοκυανίνη, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη) έχουν μελετηθεί να διαθέτουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ικανότητες, με δυνατότητα μείωσης και πρόληψης ασθενειών [98, 99, 100, 101]. Στα περισσότερα μικροφύκη, οι βιοδραστικές ενώσεις συσσωρεύονται στη βιομάζα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτοί οι μεταβολίτες απεκκρίνονται στο μέσο (υγρό διάλυμα) και αυτά είναι γνωστά ως εξωμεταβολίτες. Συνεπώς, αρκετοί βιοδραστικοί μεταβολίτες μικροαλγικής προέλευσης παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων προϊόντων για ιατρικές, φαρμακευτικές, καλλυντικές εφαρμογές αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων που πρέπει να επαληθευτούν οι ευεργετικές τους επιδράσεις για τον άνθρωπο καθώς και η αποικοδόμησή τους όταν απελευθερώνεται στο περιβάλλον και οι επιπτώσεις τους όταν χρησιμοποιούνται σε ζώα [96]. Στο πλαίσιο αυτό, στόχος της παρούσας μελέτης είναι να συζητηθούν οι μέθοδοι που εκχυλίζονται οι βιοδραστικοί μεταβολίτες που παράγονται από μικροφύκη για πιθανές εφαρμογές στις βιοεπιστήμες.

Στην παρακάτω εικόνα 7 παρουσιάζονται συνοπτικά οι ποικίλες κατηγορίες προϊόντων από φύκη και μικροφύκη αλλά και οι διάφορες εμπορικές εφαρμογές τους. Επιπλέον, στον παρακάτω πίνακα 5 παρουσιάζονται οι κυριότερες βιοδραστικές ουσίες που εξάγονται από μικροφύκη και έχουν ήδη πρακτικές εφαρμογές στη βιομηχανία και αποτελούν συστατικά εμπορικών προϊόντων.



Εικόνα 7. Η βιόμαζα φυκών και μικροφυκών ως παραγωγική πηγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η ποικιλομορφία των βιοδραστικών ουσιών που παράγονται στο θαλάσσιο περιβάλλον και οι δυνητικές οδοί εφαρμογής τους [169]

Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι υπάρχουν ήδη πολλά είδη μικροφυκών που καλλιεργούνται εμπορικά και στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζουμε εκείνα που είναι ευρέως διαδεδομένα και επιπλέον έχει ήδη δημιουργηθεί εμπειρία από την εμπορική τους εκμετάλλευση. Από αυτά οι κυριότερες εφαρμογές είναι μέχρι σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής ενώ ακολουθούν οι εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία αλλά και σε αυτή των ζωοτροφών. Θα πρέπει επίσης να συμπληρώσουμε τις προσπάθειες που γίνονται για συνδυασμένες δράσεις των μικροφυκών όπου θα λειτουργούν ταυτόχρονα σε συστήματα επεξεργασίας νερού, δημιουργίας βιοποικιλότητας, δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα και ταυτόχρονα θα παράγουν σημαντικές ουσίες για άλλες χρήσεις ή για την παραγωγή ενέργειας.

Πίνακας 5. Βασικές Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από Μικροφύκη

Είδος Μικροφύκου	Βιοδραστική ουσία
<i>Spirulina sp.</i>	Polysaccharides
<i>Spirulina Plantensis</i>	Phycocyanin, C- phycocyanin, Phenolic acids, tocopherols, (vitamin E), neophytadiene, phytol, PUFA'a (n-3) fatty acids, oleic acid, linoleic aci, palmitoleic acid
<i>Spirulina fusiformis</i>	Diacylglycerols
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin lutein, zeaxanthin, canthaxanthin, lutein, β-caroten, oleic acid
<i>Chlorella sp.</i>	Carotenoids, sulfated polysaccharides, sterols, PUFA's (n-3) fatty acids
<i>Chlorella vulgaris</i>	Canthaxanthin, astaxanthin, peptide, oileic acid Carotenoids (β-carotene), Chlorophyll a and b
<i>Chlorella minutissima</i>	Eicosipentaenoic acid (EPA)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Zeaxanthin, violaxanthin
<i>Dunaliella salina</i>	trans - Betacaroten, cis-betacaroten, β-carotene, Chlorophyll a and b, oleic acid, linoleic acid, palmitic acid
<i>Dunaliella</i>	Diacylglycerols
<i>Botryococcus braunii</i>	Linear alkadienes (C25, C27, C29 and C31), triene (C29)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxanthin
<i>Chlorella protothecoides</i>	Lutein, zeaxanthin, canthaxanthin
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Lutein, sulfated polysaccharides
<i>Nostoc linckia and Nostoc spongiaeforme</i>	Borophycin
<i>Nostoc sp.</i>	Cryptophycin

Τα μικροφύκη είναι μια ομάδα ετερογενών μικροοργανισμών που έχουν μεγάλη βιοποικιλότητα χρωμάτων, σχημάτων και χαρακτηριστικών κυττάρων και η διαχείρισή τους αποτελεί τομέα της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας. Αυτή η ανεκμετάλλευτη ποικιλομορφία έχει ως αποτέλεσμα την αναζήτηση πιθανών εφαρμογών τους σε διάφορους βιοτεχνολογικούς τομείς ως ελπιδοφόρες πηγές για νέα προϊόντα και εφαρμογές που πέραν των άλλων θα λαμβάνουν υπόψη μια πιο πράσινη και βιώσιμη ανάπτυξη [99, 102]. Μεταξύ των χιλιάδων ειδών μικροφυκών που πιστεύεται ότι υπάρχουν, μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτά διατηρούνται σε συλλογές σε όλο τον κόσμο και εκτιμάται ότι μόνο μερικές εκατοντάδες διερευνώνται για ενώσεις που υπάρχουν στη βιομάζα τους. Από αυτές, μόνο λίγες καλλιεργούνται βιομηχανικά [101]. Στο Παράρτημα 1 παρουσιάζεται μια αναλυτική λίστα με μικροάλγη και το σύνολο των χημικών στοιχείων υψηλής αξίας που μπορεί να εξαχθεί από το κάθε είδος.

Τα μικροφύκη είναι αυτοτροφικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν ελαφριά ενέργεια και ανόργανα θρεπτικά συστατικά (διοξείδιο του άνθρακα, άζωτο, φώσφορο κ.λπ.) για την ανάπτυξη και τη σύνθεση βιοσυστατικών και πολυμερών [100, 103, 104,

306]. Χαρακτηριστικά εμπορικά μικροφύκη παρουσιάζονται παρακάτω: *Spirulina*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Phaeodactylum tricornutum*.



Εικόνα 8. Μικροφύκος *Spirulina sp*



Εικόνα 9. Μικροφύκος *Nostoc sp*

Στους παρακάτω πίνακες 6 έως 10 φαίνονται χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις βιοδραστικών ουσιών μερικές εκ των οποίων μπορούν και παράγονται ήδη βιομηχανικά καθώς απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 6. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος *Spirulina* [95]

Μικροφύκος	Βιοδραστική Ουσία	Περιεκτικότητα (% w/w, DW)
<i>Spirulina fusiformis</i>	C-phycoerythrin	46.0
<i>Spirulina platensis</i>	C-phycoerythrin	9.6
<i>Spirulina platensis</i>	Allophycoerythrin	9.5
<i>Spirulina</i> sp.	C-phycoerythrin	17.5
<i>Spirulina</i> sp.	Allophycoerythrin	20.0
<i>Spirulina platensis</i>	Phenolic	0.71
<i>Spirulina platensis</i>	Terpenoids	0.14
<i>Spirulina platensis</i>	Alkaloids	3.02
<i>Spirulina maxima</i>	Phenolic	1.29
<i>Spirulina maxima</i>	Flavonoids	0.46

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι υπάρχουν ήδη καθιερωμένοι ισχυροί παραγωγοί βιοδραστικών ενώσεων από τα μικροφύκη. Ο μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο, Hainan Simai Pharmacy Co. (Κίνα), παράγει ετησίως 3000 τόνους βιομάζας σπιρουλίνας. Μία ακόμη από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες στον κόσμο στον ίδιο κλάδο είναι η Earthrise Farms (Καλιφόρνια, ΗΠΑ) (<http://www.earthrise.com/>).

Πολλές άλλες εταιρείες παράγουν και εμπορεύονται μια μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών προϊόντων που παράγονται από αυτά τα μικροφύκη. Για παράδειγμα, το εργοστάσιο σπιρουλίνας της Μιανμάρ (Yangon, Myanmar) παράγει χάπια, τηγανητές πατάτες και ζυμαρικά. Η Cyanotech (Χαβάη, ΗΠΑ) παράγει και εμπορεύεται προϊόντα με την ονομασία *Spirulina Pacifica* (<http://www.cyanotech.com/>). Στη Βραζιλία, η εταιρεία Olson Microalgas Macronutric, (Camaqua, Rio Grande do Sul) παράγει *Spirulina* sp. LEB 18 κάψουλες προς πώληση ως συμπλήρωμα διατροφής (<http://www.olson.com.br/>).

Πίνακας 7. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος *Nostoc* [95]

Μικροφύκος	Βιοδραστική Ουσία	Συγκέντρωση (% w/w, DW)
<i>Nostoc</i> sp.	Phycocyanin	20.0 (p/p)
<i>Nostoc muscorum</i>	Phenolic	0.61 (p/p)
<i>Nostoc muscorum</i>	Terpenoids	0.10 (p/p)
<i>Nostoc muscorum</i>	Alkaloids	2.30 (p/p)
<i>Nostoc muscorum</i>	Phycobilins	0.0229 (p/v)
<i>Nostoc humifusum</i>	Phenolic	0.34 (p/p)
<i>Nostoc humifusum</i>	Terpenoids	0.10 (p/p)
<i>Nostoc humifusum</i>	Alkaloids	1.65 (p/p)
<i>Nostoc humifusum</i>	Phycobilins	0.0031 (p/v)



Εικόνα 10. Μικροφύκος *Chlorella* sp

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει σε όλα τα μικροφύκη και συνεπώς και στα πλέον εφαρμόσιμα στη βιομηχανική παραγωγή, τόσο οι συνθήκες καλλιέργειας όσο και η διατροφή και το περιβάλλον τους καθορίζουν κυρίως την συγκέντρωση των βιοδραστικών ουσιών που μπορούν αυτά να παράξουν [306, 307].

Πίνακας 8. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος *Chlorella* [95]

Μικροφύκος	Βιοδραστική Ουσία	Συγκέντρωση (% w/w, DW)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Lutein	4.60
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxanthin	1.50
<i>Chlorella vulgaris</i>	Phenolic	0.20
<i>Chlorella vulgaris</i>	Terpenoids	0.09
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alkaloids	2.45
<i>Chlorella minutissima</i>	Phytol	2.70
<i>Chlorella minutissima</i>	Phenol	1.81

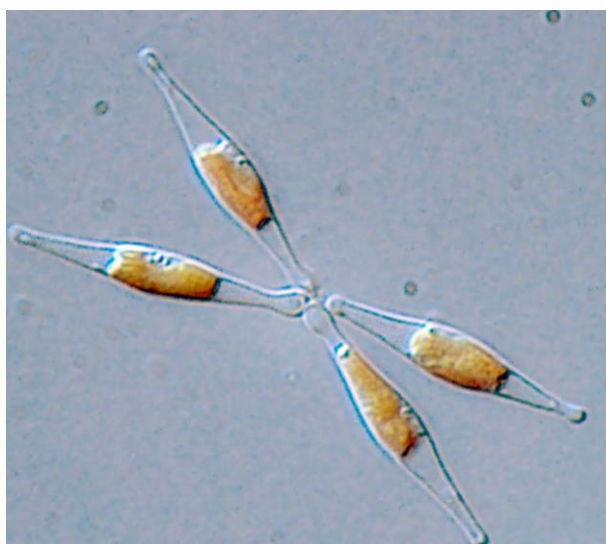


Εικόνα 11. Μικροφύκος *Dunaliella sp*

Πίνακας 9. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος *Dunaliella* [95]

Μικροφύκος	Βιοδραστική Ουσία	Συγκέντρωση (% w/w, DW)
<i>Dunaliella salina</i>	β -Carotene	0,12
<i>Dunaliella salina</i>	All-trans- β -carotene	13.8%
<i>Dunaliella salina</i>	All-trans-zeaxanthin	1.1%
<i>Dunaliella salina</i>	All-trans-lutein	0.66%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Sterols	1.3%
<i>Dunaliella salina</i>	Sterols	0.89%

Με τα παραπάνω θέλουμε να αναδείξουμε την υφιστάμενη εμπορική σημασία των μικροφυκών και των προϊόντων αυτών καθώς και τους λόγους που συνεχίζεται η έρευνα για την βέλτιστη αξιοποίησή τους ιδιαίτερα δε σε σχέση με τις πολλαπλές εφαρμογές τους [105, 106, 107, 108, 109, 110].



Εικόνα 12. Μικροφύκος *Phaeodactylum tricornutum*

Πίνακας 10. Βιοδραστικές Ουσίες που Παράγονται από το είδος *Phaeodactylum tricornutum*[461]

Είδος Μικροφύκου	Βιοδραστική Ουσία	Περιεκτικότητα % DW
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Carbohydrates, Fucoxanthin	0,7
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Carbohydrates, Chrysolminarin	14
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lipids, EPA	3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lipids, DHA	0,64
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lipids, ARA	1,89

Η μελέτη της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από διάφορα μικροφύκη, όπως *Arthrospira (Spirulina)*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus Pluvialis*, *Phaeodactylum tricornutum* και *Nostoc* που αναφέρονται και παραπάνω, έχει διερευνηθεί με διάφορες μεθόδους και αποτελεί εν μέρει αντικείμενο και αυτής της μελέτης [104, 111, 112, 459, 460].

3.3 Τα μικροφύκη ως πηγή Λιπαρών Οξέων (Ωμέγα 3)

Μέχρι σήμερα, τα φύκη και τα μικροφύκη αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως πηγές βιοδραστικών ενώσεων⁵ για χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων αλλά στην πράξη η ουσιαστικές παραγωγές τελικών προϊόντων από αυτόν κλάδο είναι περιορισμένες σε ποσότητες [155, 156]. Η τεράστια ποικιλομορφία όσον αφορά τον αριθμό διαφορετικών ειδών μακρο- και μικροφυκών που υπάρχουν, σε συνδυασμό με τα εχθρικά περιβάλλοντα στα οποία ζουν αυτοί οι οργανισμοί, τους καθιστούν μακροπρόθεσμους και μικροσκοπικούς στόχους για έργα δοκιμών παραγωγής τόσο βιοενεργών ουσιών (λιπαρά οξέα) όσο και προϊόντων ενέργειας [287, 288, 289].

Τα φύκη αποτελούν μια πολύπλοκη και ετερογενή ομάδα οργανισμών που χαρακτηρίζονται από τη φωτοσυνθετική τους φύση και τις απλές αναπαραγωγικές τους δομές. Ανάλογα με το μέγεθός τους, τα άλγη μπορούν να χωριστούν σε μονοκύτταρους οργανισμούς, γνωστούς ως μικροφύκη και πολυκύτταρους οργανισμούς που αναφέρονται ως μακροφύκη. Τα άλγη ζουν συχνά σε ακραία περιβάλλοντα φωτός, αλατότητας και θερμοκρασίας. Προκειμένου να προσαρμοστούν σε αυτές τις ακραίες συνθήκες, τα περισσότερα φύκη παράγουν μια μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών που συχνά έχουν ισχυρές βιολογικές δραστηριότητες.

Τα περισσότερα άλγη είναι σχετικά εύκολο να καλλιεργηθούν ή να παραχθούν σε βιομηχανική κλίμακα. Έτσι, η παραγωγή βιολογικά ενεργών ενώσεων που προέρχονται από φύκη μπορεί να συντονιστεί με την επιλογή κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας, κάνοντάς τα πραγματικούς φυσικούς βιοαντιδραστήρες. Σε μερικές από αυτές τις δοκιμές απομονώθηκαν ενδιαφέρουσες λειτουργικές ενώσεις (Kadam και Prabhasankar 2010, Kim και Wijesekara 2010). Το μικροφύκος *Chorella* που ανακαλύφθηκε αρχικώς από Γιαπωνέζους, παραδοσιακούς καταναλωτές μικροάλγων που τα χρησιμοποιούν ήδη στην παραδοσιακή τους κουζίνα, είναι πλούσιο σε χλωροφύλλη, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, αμινοξέα αλλά μπορεί να φτάσει έως και 5% περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα [114, 321].

Επίσης, το πράσινο μικροφύκος *Neochloris oleabundans* είναι γνωστό για την αύξηση των λιπαρών οξέων που περιέχει όταν καλλιεργείται σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και μάλιστα αναφέρεται ότι όταν το παραπάνω μικροφύκος καλλιεργείται σε περιβάλλον

⁵ Plaza et al., 2009, Plaza et al., 2008

με αφθονία αζώτου τότε αυξάνει τη χλωροφύλλη του και το ρυθμό αναπαραγωγής του [115, 116]. Όταν όμως βρεθεί σε συνθήκες περιορισμού του διαθέσιμου αζώτου τότε εξακολουθεί να αυξάνει τη βιομάζα του ωστόσο τώρα το κυρίαρχο συστατικό είναι λιπαρά και έλαια.

Γενικότερα, σε πολλές μελέτες παρατηρείται και καταγράφεται ότι η έλλειψη αζώτου προκαλεί αύξηση της παραγωγής λιπαρών οξέων στα μικροάλγη. Μάλιστα ο Ho et al έχει καταδείξει ότι μια καλλιέργεια αζωτοπενίας 5 ημερών έχει την υψηλότερη απόδοση σε λιπαρά οξέα καθώς προκαλεί αύξηση κατά 22,40% [117]. Αντίστοιχη είναι και η παρατήρηση για το μικροφύκος *Chorella zofingiensis* το οποίο αυξάνει σημαντικά την παραγωγή λιπαρών οξέων απουσία ή ελλείψει αζώτου [118]. Αντίστοιχα ευρήματα υπάρχουν και με την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών αλατότητας, φωτός ή και άλλων βασικών στοιχείων διατροφής. Εξάλλου, το μικροάλγος *Ankistrodesmus falcatus* αυξάνει τη συγκέντρωσή του σε λιπαρά οξέα κατά 55,3% όταν η αλατότητα αυξάνεται σε 160mM [119].

Άλλο ένα παράδειγμα αυξημένης παραγωγής λιπαρών οξέων είναι η καλλιέργεια του μικροφύκου *Chorella Vulgaris* σε καθεστώς αυξημένης έντασης φωτός για φωτοπερίοδο 16:8h (φως/σκοτάδι) με 100μmol photos/m²s με μέγιστη παραγωγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) 15.93% και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) 27.40%.

Συνεπώς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω με την επιλογή ειδικών συνθηκών καλλιέργειας πολλά μικροφύκη αναπτύσσουν σημαντική αύξηση στα περιεχόμενα λιπαρά [120, 121]. Η καλλιέργεια ακριβείας είναι πλέον εκείνη που καθορίζει την αποτελεσματικότητα ως προς την αύξηση της παραγωγής της βιοδραστικής ουσίας που στοχεύει η κάθε εκμετάλλευση [122, 123, 124, 125, 121]

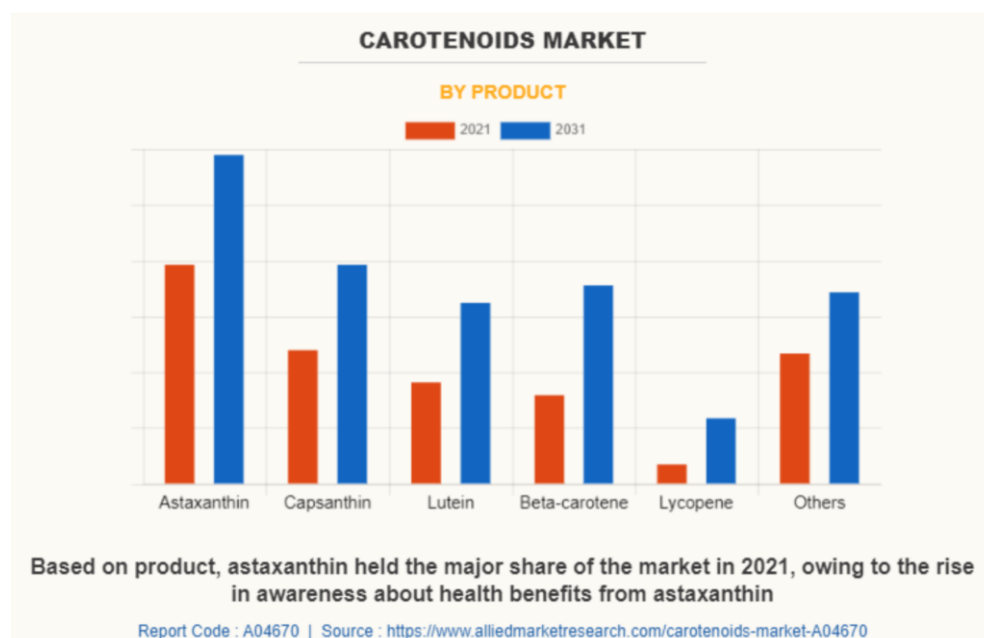
3.4 Τα μικροφύκη ως πηγή Φυσικών Αντιοξειδωτικών και Χρωστικών

Μια άλλη σημαντική κατηγορία βιοδραστικών αλλά και χρηστικών ουσιών που παράγουν τα μικροφύκη είναι τα αντιοξειδωτικά και οι χρωστικές με σημαντικότερα τα καροτενοειδή και ειδικότερα την ασταξανθίνη και το β-καροτένιο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλες χρωστικές ουσίες με ισοπρενοειδείς δομές που εμφανίζονται σε υψηλότερα φυτά, μικροφύκη και σε μη φωτοφωσυνθετικούς οργανισμούς [126, 127]. Τα περισσότερα καροτενοειδή έχουν θεραπευτική αξία, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών δραστηριοτήτων, οι οποίες αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στην ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση που χρησιμοποιείται για την προστασία των οργανισμών από το οξειδωτικό στρες. Η εμπορική αξία της αγοράς των καροτενοειδών (Dhanraj L , Roshan D, FB : Nutraceutical/Wellness Food Report Code: A04670 Mar 2023) ήταν περίπου 1,8 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ το 2021 και εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 2,7 δισεκατομμύρια δολάρια το 2031, με το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής καροτενοειδών να γίνεται με χημική σύνθεση.

Η σύνθεση των καροτενοειδών υποβοηθείται με τη χρήση φυκών και μικροφυκών, τα οποία χρησιμεύουν κυρίως ως βοηθητικές χρωστικές ουσίες στη φωτοσύνθεση [128]. Οι ενώσεις που αποτελούνται μόνο από υδρογονάνθρακες είναι καροτένια, ενώ εκείνες με οξο, υδροξυλικές ή εποξειδικές ομάδες ονομάζονται ξανθοφύλλες. Στον παρακάτω πίνακα 11 φαίνονται τα σημαντικότερα εμπορικά καροτενοειδή και η κατανομή τους σε διάφορες εμπορικές κατηγορίες παρουσιάζεται στο παράρτημα 5.

Πίνακας 11. Εξέλιξη της Αγοράς Καροτενοειδών



Υπάρχουν πάνω από 400 καροτενοειδή που εντοπίζονται σε ζωντανούς οργανισμούς: μεταξύ αυτών, το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη που διατίθενται ευρέως στο εμπόριο καθώς και η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το λυκοπένιο που χρησιμοποιούνται σε μικρότερο βαθμό ενώ αυτά και πολλά άλλα με πλούσια αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν εφαρμογές σε τρόφιμα, καλλυντικά και φάρμακα [129, 130]. Σημαντικές ενώσεις, όπως το διμεθυλοσουλφονιοπείονικό και τα αμινοξέα της μυκοσπορίνης, απομονώθηκαν από τα μικροφύκη και είναι ισχυροί χημικοί αναστολείς της υπεριώδους ακτινοβολίας [131].

Τα καροτενοειδή και οι φυτοκυανίνες είναι οι χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην επιστημονική έρευνα. Η C-φυτοκυανίνη (C-PC) είναι μια μπλε φωτοσυνθετική χρωστική ουσία που ανήκει στην ομάδα των φυτοβιοπρωτεϊνών που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα κυανοβακτήρια, *Rhodophyta* και *Cryptophyte* [132]. Η φυκοκυανίνη έχει εφαρμογές ως τόσο ως θρεπτικό συστατικά αλλά κυρίως ως φυσική χρωστική τροφίμων και καλλυντικών. Συνήθως εκχυλίζεται από τη βιομάζα της *Spirulina*, του *Porphyridium cruentum* και του *Synechococcus* [132, 133, 134].

Μεταξύ των καροτενοειδών ενώσεων το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη είναι ως αναφέρθηκε τα πλέον κυρίαρχα και μελετημένα. Αυτές οι ενώσεις έχουν εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και της ικανότητας χρώσης. Στον μικροαλγικό μεταβολισμό, προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από βλάβες που προκαλούνται από το φως και το οξυγόνο [135]. Η *Dunaliella salina* είναι ένα μικροφύκος αναγνωρισμένο ως σημαντική βιολογική πηγή χρωστικής β-καροτίνης, παράγοντας περισσότερο από 14% στην ξηρή βιομάζα της [129]. Η *H. pluvialis* είναι μια πηγή της χρωστικής ασταξανθίνης, παράγοντας 1-8% ασταξανθίνης ως ποσοστό της ξηρής βιομάζας [136].

Οι πολυσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν μια ακόμη κατηγορία συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας με εφαρμογές σε τρόφιμα, καλλυντικά, υφάσματα, σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές και φάρμακα [137]. Οι μικροαλγαλικοί πολυσακχαρίτες περιέχουν θεικούς εστέρες, αναφέρονται ως θειωμένοι πολυσακχαρίτες και διαθέτουν μοναδικές ιατρικές εφαρμογές [170]. Η βιολογική δραστηριότητα των πολυσακχαριτών θείου συνδέεται με τη σύνθεση, το μοριακό τους βάρος, τη θέση και το βαθμό θείωσης των σακχάρων [138]. Μεταξύ των μικροφυκών

που είναι ικανά να παράγουν αυτές τις ενώσεις είναι η *Chlorella vulgaris*, ο *Scenedesmus quadricauda* [139], και *Porphyridium sp.* [140].

Ως πρώτο συμπέρασμα θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι οι κυριότερες χρωστικές και αντιοξειδωτικές ουσίες που παράγονται ευρέως σήμερα αλλά εξακολουθούν να μελετώνται και να έχουν ερευνητικό και ισχυρό οικονομικό ενδιαφέρον είναι το β-καροτένιο, η Ασταξανθίνη, η Καθαξανθίνη και η Λουτεΐνη.

Το β-καροτένιο θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα καροτενοειδή επειδή έχει μια ενεργή μορφή προβιταμίνης Α, ένα πρόσθετο που χρησιμοποιείται σε πολυβιταμινούχα παρασκευάσματα αλλά και προϊόντα υγιεινής διατροφής. Η φυσική μορφή αυτής της χρωστικής ουσίας έχει ισχυρότερη επίδραση και μπορεί εύκολα να απορροφηθεί από το σώμα σε σύγκριση με τη συνθετική μορφή [141]. Η αυξανόμενη ζήτηση φυσικών καροτενοειδών είχε ως αποτέλεσμα το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξαγωγή β-καροτίνης από διαφορετικές φυσικές πηγές. Τέτοια είναι τα μικροφύκη *D. Salina* που είναι πράσινα, αλοφιλικά, μικροφλοιώδη και παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις β-καροτίνης, έως και 10-14% ξηρού βάρους [144, 145].

Ειδικές συνθήκες καλλιέργειας όπως η υψηλή ένταση φωτός, η υψηλή αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες και τα συμπληρώματα θρεπτικών ουσιών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της παραγωγής β-καροτίνιου [142, 143]. Το βέλτιστο πρόγραμμα διατροφής αλλά και οι ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες είναι απαραίτητα για την εμπορική παραγωγή β-καροτίνης και, κατά προτίμηση, και των δύο ισομερών 9-cis [146, 147]. Το φυσικό 9-cis ισομερές παίζει σημαντικό ρόλο στην απόσβεση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, προστατεύοντας τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες [148]. Η trans μορφή της β-καροτίνης είναι δύο φορές πιο ενεργή μορφή στο σχηματισμό βιταμίνης Α, και πολλές βιομηχανίες στην Αυστραλία, το Ισραήλ, τις ΗΠΑ και την Κίνα παράγουν αυτόν τον μεταβολίτη [149, 150].

Το β-καροτένιο προέλευσης μικροφυκών έχει δείξει ότι έχει προστατευτικές ιδιότητες κατά της αθηροσκλήρωσης τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή προγράμματος διατροφής με *Dunaliella Salina* πλούσια σε περιεκτικότητα β-καροτίνιου, αναστέλλει την οξείδωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και επηρεάζει τα τριγλυκερίδια πλάσματος, τη χοληστερόλη και τα επίπεδα λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) [151]. Ο Phang (2007) ανέφερε ότι η κατανάλωση συμπληρωμάτων β-καροτίνης από *H. dunaliella bardawil* έχει

αποδειχθεί ότι αναστέλλει την οξειδωση της χοληστερόλης LDL διαβητικών ασθενών και μπορεί να είναι επίσης σημαντική για την καθυστέρηση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης [154]. Ωστόσο, πολλές επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι οι άνθρωποι που τρέφονταν με μια διατροφή πλούσια σε β-καροτένιο διατηρούν τα επίπεδα ορού ενώ μειώθηκε η συχνότητα εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου και εκφυλιστικών ασθενειών [150].

Επιπλέον του β-καροτένιου, άλλα καροτενοειδή από *Dunaliella*, όπως το φυτοένιο και το φυτοφλουόλιο, είναι επίσης γνωστό ότι έχουν οφέλη για την υγεία, όπως η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και την οξειδωτική βλάβη, η οποία οδηγεί σε πρόωρη γήρανση και άλλες διαταραχές [152]. Διαθέτει επίσης ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό για να δεσμεύει επιβλαβείς οξειδωτικές ρίζες, οι οποίες συνδέονται συνήθως με την πρόκληση ορισμένων μορφών δυσπλασιών. Η πρόσληψη β-καροτίνης από το στόμα από *Dunaliella sp.* μπορεί να αποτρέψει την πρόκληση ερυθρήματος από την υπεριώδη ακτινοβολία στον άνθρωπο [153].

Αποτελεί ωστόσο, ως έχει αναφερθεί, σημαντικό ερευνητικό αντικείμενο να εξεταστεί το πώς τα λειτουργικά συστατικά αποκτώνται από νέες πηγές, όπως μικρο- και μακροφύκη. Από την άποψη αυτή, υπάρχει ανάγκη συνδυασμού κατάλληλων, επιλεκτικών, οικονομικά αποδοτικών και φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών εκχύλισης με τις κανονιστικές και νομοθετικές απαιτήσεις σχετικά με τη χρήση διαλυτών και διαδικασιών ποιότητας τροφίμων.

Θα θέλαμε επιπλέον να προσθέσουμε τη χρήση των υπολειμμάτων των εκχυλίσεων των μικροφυκών ως στοιχεία για την παραγωγή αλγινικών αλάτων και φυσικών μιγμάτων που χρησιμοποιούνται ήδη στη βιομηχανία ζωοτροφών για την παραγωγή ρυθμιστικών συμπληρωμάτων για τα μηρυκαστικά (Nuwen, Calsea Powder). Δοκιμές των παραπάνω γίνονται σήμερα και σε συνδυασμό με μελάσα εσπεριδοειδών, και τα ζώα (βοοειδή, αγελάδες και πρόβατα) δείχνουν να ανταποκρίνονται θετικά αυξάνοντας την απόδοση και έχοντας λιγότερες προσβολές και επιμολύνσεις.

Τα μικροφύκη είναι γενικά από τους φθηνότερους οργανισμούς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Demirel, Yilmaz, Ozdemir, & Dalay, 2018) [171] και μπορούν να παράγουν επιπλέον όσων αναφέραμε και διάφορες άλλες ενώσεις όπως χλωροφύλλη, φαινολικά και πρωτεΐνες (Rao, Reddy, & Aradhya, 2010) με σημαντικές ιδιότητες στις οποίες έχουμε ήδη αναφερθεί [172, 173].

Η χρήση των ακραιόφιλων μικροφυκών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές έχει μεγαλύτερες δυνατότητες γιατί διατηρούν τη ζωτικότητα τους, παράγοντας πιο σταθερά υλικά κατά την προσαρμογή στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μεταξύ των ακραιόφιλων μικροφυκών, τα είδη *Dunaliella* είναι ικανά να διατηρήσουν την επιβίωσή τους κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού έως και 35% και είναι γνωστά ως ο μόνος ευκαρυωτικός φωτοσυνθετικός οργανισμός που έχει βρεθεί σε μερικές συμπυκνωμένες αλατούχες λίμνες [174]. Υπό συνθήκες στρες, τα ακραιόφιλα μικροφύκη μπορεί να παράγουν μοναδικές ουσίες για την προσαρμογή των μεταβαλλόμενων συνθηκών. Έτσι, με τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές απαιτήσεις, η περιεκτικότητα των βιοδραστικών ενώσεων μπορεί επίσης να αλλάξει. Είναι γνωστό ότι τα φύκη είχαν ένα χημικό αμυντικό σύστημα που συντίθεται για να επιβιώσει σε ένα ανταγωνιστικό περιβάλλον σύμφωνα με τους Barros, Pinto, Sigaud-Kutner, Cardozo, & Colepicolo [175].

Έχουν διερευνηθεί εκχυλίσματα ειδών *Dunaliella* που έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων μικροοργανισμών. Ο Chang et al. (1993) έδειξε ότι τα ακατέργαστα εκχυλίσματα του *D. primolecta* είχαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* και *Enterobacter aerogenes* και αυτά τα εκχυλίσματα περιείχαν ουσίες με αντιβιοτικές ιδιότητες [176]. Το *D. primolecta* ερευνήθηκε επίσης από τους Ohta, Shiomi, Kawashima, Aozasa, & Nakao (1995) [177]. Σε αυτή τη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι τα μικροφύκη παρήγαγαν βιοδραστικές ενώσεις έναντι του *S. aureus* (MRSA). Τα εκχυλίσματα μεθανόλης των μικροφυκών περιελάμβαναν λινολενικό οξύ το οποίο ήταν βιοδραστικό. Οι Mendiola et al., (2008) μελέτησαν τις επιδράσεις διαφορετικών θερμοκρασιών και πιέσεων στα εκχυλίσματα CO₂ από το *D. salina* και τις αντιμικροβιακές τους δραστηριότητες [178]. Οι Srinivasakumar & Rajashekhar (2009) πραγματοποίησαν πειράματα με *D. salina* και χρησιμοποίησαν διαφορετικούς διαλύτες για να λάβουν εκχυλίσματα μικροφυκών. Σε αυτή τη μελέτη, παρατήρησαν την πιο αποτελεσματική βιοδραστική ένωση στα εκχυλίσματα βουτανόλης [179]. Οι Krishnakumar, Bai, & Rajan (2013) καλλιέργησαν το *D. salina* για να βρουν αντιμικροβιακή δράση των βιοδραστικών μεταβολιτών που παράγονται από αυτό το μικροφύκος. Διαπίστωσαν ότι τα εκχυλίσματα με μείγμα χλωροφορμίου και μεθανόλης είχαν την πιο αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση [180].

Οι επιδράσεις των μέσων και των περιβαλλοντικών συνθηκών στην αντιμικροβιακή δράση του *D. salina* διερευνήθηκαν σε επιστημονικά άρθρα που διερεύνησαν την αυτή τη δράση του. Σε μελέτη που έγινε από τους Krishnakumar, Bai, & Rajan (2013) με *D. Salina*, οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία και η αλατότητα μελετήθηκαν ως παράγοντας τελεστή που επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση. Έχουν απομονωθεί είδη *Dunaliella* που παράγουν υψηλή βιομάζα και παρουσιάζουν αντοχή σε διάφορους ρύπους και αυτά τα είδη χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθούν οι ικανότητες αντιμικροβιακής δράσης τους έναντι βακτηρίων.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι διαφορετικές συνθήκες στρες, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα είδη *Dunaliella*. Το *Dunaliella sp.2* είχε την υψηλότερη ικανότητα στην παραγωγή αποτελεσματικών βιοδραστικών ενώσεων έναντι διαφορετικών βακτηρίων, ενώ έγινε έλεγχος δραστηριότητας σε μάρτυρα *E. Coli H57*. Περαιτέρω, η αντιμικροβιακή δράση αυξήθηκε σε συνθήκες στρες. Το οσμωτικό στρες βρέθηκε το πιο αποτελεσματικό. Το στεατικό οξύ από λιπαρά οξέα, η λουτεΐνη από χρωστικές ουσίες και μια απλή φαινόλη ως σιδηρουλικό οξύ προσδιορίστηκαν από τις πολικές ενώσεις με την υψηλότερη ποσότητα σε εκχυλίσματα γλωροφόρμιου του μικροάλγους. Θα μπορούσε να αναφερθεί ότι η λουτεΐνη και το σιδηρουλικό οξύ ήταν υπεύθυνα και για υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση υπό συνθήκες στρες. Μπορεί τέλος να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το *Dunaliella sp.2* είναι ένα ασφαλές ευεργετικό βιοϋλικό που χρησιμοποιείται στον τομέα της φαρμακολογίας σύμφωνα με τις βιοδραστικές του ιδιότητες [159].

Οι αντιβακτηριαδικές δράσεις των μικροαλγών μπορούν συνοπτικά πιθανώς να ερμηνευτούν με τους παρακάτω μηχανισμούς [160]:

1. Ο γενετικός μετασχηματισμός από στέλεχος σε στέλεχος.
2. Δυναμικό σχηματισμού μήτρας βιοϋμενίου διαφόρων στελεχών.
3. Αντλίες εκροής και άλλες δομικές παραλλαγές της εξωτερικής μεμβράνης.
4. Ενζυμική αντοχή εναντίον, στην πράξη, των αντιμικροβιακών.
5. Ενισχυμένο επίπεδο μεταβολικής δραστηριότητας εντός της δομής του βιοϋμενίου.
6. Χαμηλότερη/καθόλου αιμάτωση αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω της μήτρας βιοϋμενίου.

7. Προσαρμοστικότητα και αλληλεπίδραση μεταξύ αντιμικροβιακών παραγόντων και μήτρας βιοϋμενίου.

8. Υπερβολική/άχρηστη κατανάλωση στην πράξη αντιμικροβιακών ουσιών με τυχαία σειρά.

9. Γενετική ποικιλότητα και προσαρμοστικότητα έναντι της υπερβολικής έκθεσης σε αντιμικροβιακά

Οι αντιϊκές δράσεις των εκχυλισμάτων μπλε-πράσινων φυκών, δηλαδή, *Lyngbya lagerheimii* και *Phormidium tenue* έναντι του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) μαζί με την προστατευτική δυνατότητα για ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή T κύτταρα από την κυτταροπαθητική επίδραση της λοίμωξης HIV έχουν επίσης αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες [161]. Μια νέα κατηγορία αναστολέων του HIV που ονομάζεται σουλφονικό οξύ που περιέχει γλυκολιπίδια, απομονώθηκαν από το εκχύλισμα μπλε-πράσινων φυκών και οι ενώσεις βρέθηκαν να είναι δραστικές κατά HIV [162, 163].

Άλλες μελέτες, έχει επίσης αναφερθεί ότι ένας θειωμένος πολυσακχαρίτης, το *Calcium-Spirulinate* (Ca-SP), αναστέλλει επιλεκτικά την είσοδο ιού με περίβλημα (απλός έρπης, ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός, ιός ιλαράς) στο κύτταρο [164, 165, 166]. Οι Dey et al. ανέφεραν πολλαπλές αντιϊκές δράσεις της κυανοβιρίνης-N αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση του HIV τύπου 1 gp120 με CD4 και συνυποδοχέα και αναστολή ποικίλων περιβαλλόντων ιών [167]. Ομοίως, τα κόκκινα φύκη όπως το *Porphyridium* παράγουν επίσης έναν θειωμένο πολυσακχαρίτη ο οποίος είναι σε θέση να αναστέλλει την ιογενή λοίμωξη εμποδίζοντας την προσρόφηση των τύπων 1 και 2 των ιών του απλού έρπητα (HSV 1 και 2), και ιούς ανεμοεβλογιάς και έρπη ζωστήρα στα κύτταρα ξενιστές και/ή αναστέλλοντας την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων μέσα στα κύτταρα ξενιστές [168]. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της αντιϊκής δράσης των εκχυλισμάτων φυκών και των βιοδραστικών ενώσεων με βάση τα φύκη δεν έχουν ακόμη πλήρως ερμηνευτεί και αποτελούν αντικείμενο μελέτης επόμενων ερευνών.

Κεφάλαιο 4: Μέθοδοι Παραλαβής των Βιοδραστικών Ουσιών από Μικροφύκη

4.1 Επισκόπηση των μεθόδων εκχύλισης και παραλαβής βιοδραστικών ουσιών από μικροφύκη

Είναι γεγονός ότι με την πάροδο των ετών, έχουν γίνει ήδη αρκετές σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από μικροάλγη με την χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών για διάφορες εφαρμογές. Για παράδειγμα, η χρήση βιοδραστικών ενώσεων σε ποικίλους εμπορικούς τομείς, όπως οι βιοϊατρικές, φαρμακευτικές, κοσμητικές, διατροφικές αλλά και χημικές εφαρμογές, έχει ωθήσει την έρευνα σε νέα πεδία ώστε να καλύψει την ανάγκη των καταλληλότερων αλλά και των πλέον τυποποιημένων μεθόδων για την εξαγωγή αυτών των βιοδραστικών συστατικών με τον πιο εξελιγμένο και οικονομικά αποδοτικό τρόπο [272, 329, 338, 341].

Στην πράξη, αρκετές συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης έχουν πολλούς περιορισμούς όπως χαμηλότερη αποτελεσματικότητα, υψηλό κόστος ενέργειας, χαμηλή απόδοση κ.λπ. γεγονός που προτρέπει την έρευνα για νέες και σύγχρονες μεθοδολογίες εκχύλισης που θα λαμβάνουν υπόψη τις προκλήσεις της εποχής [366, 367]. Έτσι, η βελτιστοποίηση μαζί με την ενσωμάτωση αποτελεσματικών τεχνικών προεπεξεργασίας που ακολουθούνται από παραδοσιακές διαδικασίες εκχύλισης και καθαρισμού, υπήρξαν ο πρωταρχικός στόχος των σύγχρονων μελετών έρευνας και ανάπτυξης [347].

Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία και έχουμε ήδη αναφέρει παραπάνω, τα βιοδραστικά-προϊόντα φυκών περιλαμβάνουν βιοκαύσιμα, λιπίδια, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, χρωστικές ουσίες, ένζυμα, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες που πρέπει να εξαχθούν από τα κύτταρά τους με φυσικές, χημικές και βιολογικές επεξεργασίες [462]. Η ανάκτηση προϊόντων από βιομάζα φυκών είναι θέμα συνεχούς ανάπτυξης και προόδου. Μια σύνοψη των μεθόδων με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 12.

Πίνακας 12. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των Σύγχρονων Μεθόδων Διάσπασης των Κυττάρων στη Βιοτεχνολογία των Μικροφυκών [285]

Μέθοδοι	Λειτουργία Σε Βιομηχανική Κλίμακα	Κατάλληλο για Εμπορικές Εφαρμογές	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
High pressure homogeniser	Y	-	Destruction of cell walls at room temperature, effective for neutral lipid extraction	High energy input, not effective for extraction of high molecular weight proteins
Mechanical cell press	Y	-	Industry standard for oil recovery from oilseeds	Inefficient cell disruption, high energy input
Hydrodynamic cavitation	Y	-	Relatively low energy input	Cavitation area limited
Horn sonication	Y	++	Effective cell wall disruption, low maintenance cost, relatively rapid process, hazardous chemicals are not required	Multiple units required, cavitation area limited, high operational costs and energy input
Bath sonication	X	+++	Effective cell wall disruption, minimal maintenance cost, relatively rapid, no hazardous substances required	High operational costs and energy input
Microwaves	Y	++++	Effective cell wall disruption and excellent recovery of bioactives, relatively low energy input, fast heating and short reaction time, reduced solvent usage	Generates heat, high maintenance cost
Bead milling/beat beating	Y	++	Effective cell wall disruption, rapid extraction	Varied efficiency across species, additional step required to remove beads, high maintenance costs and energy input
Osmotic shock	X	-	Low energy input, easier to scale-up	Inefficient cell disruption, generation of waste saltwater, time consuming
Acid/alkali	Y	-	Low energy input	Requires disposal of acid/alkali after extraction, carotenoid degradation
Enzymatic hydrolysis	Y	++	Effective cell wall hydrolysis, high selectivity, mild treatment, carotenoid bioactivity not affected	High cost of enzymes, longer treatment time, enzymes must be disposed of after use
Autoclave	X	+	Low maintenance cost	High energy input, not suitable for pigments
Steam explosion	Y	++++	Effective cell wall disruption, low maintenance costs, relatively low energy input	Varied efficiency across species
Freeze drying	Y	+	Mild operating conditions, drying and extraction can be incorporated in one step, does not affect cellular components	Cell disruption variable and often the integrity of the cell wall is weakened but not disrupted, cost associated with pump maintenance, time consuming, expensive, high energy input
Nanoparticles	X	-	Non-toxic	Expensive, additional step required to remove nanoparticles, technology in its infancy
Supercritical fluid extraction	Y	+	Polarity of solvent is tunable, fast process, uses non-toxic solvents such CO ₂ , effective for carotenoid extraction	Expensive, not suitable for scale-up
Grinding (with/without cryogens)	X	-	Quick and efficient at a laboratory-scale	Time consuming, degradation of some of the bioactives
Pulse electric field	Y	+	High selectivity, mild treatment, carotenoid bioactivity not affected, relatively low energy input	Still in its infancy
Hydrothermal liquefaction	X	-	Uses a wet feedstock	High variability in recovery, high energy input and temperature, requires expensive catalyst
Ionic liquids	X	-	Low cost Still in	Still in their infancy, issues over toxicity
Soxhlet extraction	N	+	Cost-effective, easy to scale-up	Long extraction time, uses large amounts of solvents (often toxic)

Y: Ναι; x: Όχι; -: Όχι Κατάλληλο; +: Ασθενώς; ++: Μέτριο; +++: Υψηλό; ++++: Υψηλότερο; +++++: Ίδανικό.

Θα αναφερθούμε παρακάτω στις πιο πρόσφατες εξελίξεις στις μεθοδολογίες εκχύλισης, όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (EAE), η εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (SFE), η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE),

εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (UAE) και η εκχύλιση υπό πίεση υγρών (PLF) καθώς και στον μηχανισμό τους για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από πηγές με βάση τα μικροφύκη με σκοπό την αντιμετώπιση των προκλήσεων και της αξιοποίησης των ευκαιριών της βιοοικονομίας [181, 322]. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα χαρακτηριστικά σχεδιασμού, την αξιολόγηση των επιδόσεων και τις συγκεκριμένες εφαρμογές των διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων. Τέλος, παρέχονται επίσης πληροφορίες σχετικά με τα πιθανά ερευνητικά κενά, τις μελλοντικές προοπτικές αλλά και παρατηρήσεις εξέλιξης σχετικά με τις μεθόδους εκχύλισης.

Τα ολοένα αυξανόμενα οικολογικά, κοινωνικά και οικονομικά θέματα παράλληλα με ένα πιο εκτεταμένο πεδίο εφαρμογής της τρέχουσας έρευνας, η χρήση βιοδραστικών συστατικών από φυσικές πηγές όπως η βιόμαζα μικροφυκών είτε κατηγορίας (1) γλυκού νερού ή (2) θαλάσσιου νερού αποδεικνύεται πλέον ευεργετική και αποδεκτή. Η τάση μεταξύ των ερευνητών οφείλεται στην εύκολη προσβασιμότητα και τη λιγότερη παρενέργεια από την εκμετάλλευση τέτοιων φυσικών πηγών με βάση τα φύκη που είναι ιδιαίτερα αποδοτικά, οικονομικά προσοδοφόρα αλλά και πιο πράσινα [373]. Έτσι, λέξεις όπως ανανεώσιμες, αποικοδομήσιμες και ανακυκλώσιμες πηγές τονίζονται συνεχώς στην αυξανόμενη περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση και αποτελούν κριτήρια επιλογής αγαθών για τον σύγχρονο καταναλωτή [182, 183].

Στο πλαίσιο αυτό, οι φυσικές πηγές που βασίζονται στην ολοκληρωμένη μετάβαση για την αντιμετώπιση των προκλήσεων και των ευκαιριών της βιοοικονομίας έχουν τις ακόλουθες αιτιολογήσεις με τις οποίες θα αξιολογηθούν και οι μέθοδοι εκχύλισης [184]:

- i) να διαφυλάξει το φυσικό οικοσύστημα
- ii) να μετριάσει ή να μειώσει την τρέχουσα αύξηση των τιμών
- iii) να προκαλέσει ευαισθητοποίηση σχετικά με τα παγκόσμια κλιματικά ζητήματα
- iv) να τονωθεί η πιο πράσινη ανάπτυξη των περιφερειακών και αγροτικών περιοχών
- v) να μειώσει τις δραστηριότητες που προκαλούν εκπομπές αερίων θερμοκηπίου
- vi) να ενισχύσει και διαφοροποιήσει τις βιο-ανανεώσιμες πηγές ενέργειας

- vii) να μετριάσει την υπερβολική εξάρτηση από πετροχημικά ή/και άλλες πηγές ορυκτών καυσίμων
- viii) να μειώσει την υπερκατανάλωση του πετρελαίου, του φυσικού αερίου, του άνθρακα και άλλων δυνητικών ορυκτών

Η ανάπτυξη διακριτών μεθοδολογιών ή/και στρατηγικών είναι στην πράξη βελτίωση των βιολογικών τεχνολογιών αιχμής που υποστηρίζουν την πράσινη ατζέντα. Η συνεργατική χρήση φυσικών υλικών όπως αυτά από πηγές με βάση τα φύκη σε συνδυασμό με πράσινες τεχνολογίες ανάκτησης και εκμετάλλευσης είναι απολύτως απαραίτητες και αναγκαίες για τη δημιουργία βιώσιμης παραγωγής προϊόντων προστιθέμενης αξίας με πολυλειτουργικές δυνατότητες και έχουν εξαιρετικές δυνατότητες να καταργήσουν τη δημιουργία σπάταλων μέτρων προστασίας [182, 342]. Με αυτά τα κριτήρια και στόχο την ανάπτυξη μεθοδολογιών και προϊόντων που έχουν πραγματικά φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα, ή ουδέτερη παρενέργεια στο οικοσύστημα, και εμπίπτουν στην έννοια της βιωσιμότητας, η ερευνητική κοινότητα αλλά και ο ακαδημαϊκός και ο βιομηχανικός κλάδος εξετάζουν κυρίαρχες λύσεις λαμβάνοντας υπόψη τις πράσινες αξίες από την πράσινη ατζέντα [184, 308, 309].

4.2 Συμβατικές και Μη-Συμβατικές Μέθοδοι Εκχύλισης

Αναλύοντας τα στοιχεία της βιβλιογραφίας, διαπιστώνεται ότι έχουν ήδη δοκιμαστεί και αξιοποιηθεί διάφοροι τύποι συμβατικών τεχνικών για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από διάφορα υλικά, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων πηγών. Οι υφιστάμενες συμβατικές ή κλασικές τεχνικές εκχύλισης περιλαμβάνουν τις παρακάτω: (1) υδατική απόσταξη η οποία διαιρείται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες, δηλαδή, i) απόσταξη με νερό· ii) απόσταξη με νερό και ατμό και iii) άμεση απόσταξη ατμού· (2) εκχύλιση Soxhlet (3) διαβροχή· (4) διύλιση· (5) έγχυση, (6) θερμή (ή με βρασμό) υδατική εκχύλιση· και (7) θερμή συνεχής εκχύλιση κ.λπ. [311, 316]

Η βασική και πλέον διαδεδομένη μέθοδος για την εκχύλιση οργανικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των φυτικών φαρμακευτικών πρώτων υλών, των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και των φαινολών από διάφορες βάσεις (εδάφη, ιλύες λυμάτων, φρούτα, λαχανικά, φυτά, θαλάσσιες πηγές κ.α), είναι η Soxhlet [185, 186]. Ωστόσο, πολλές από τις προαναφερθείσες τεχνικές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από διάφορες παραμέτρους που επηρεάζουν την απόδοσή τους, όπως η

ικανότητα εκχύλισης των διαλυτών, το μέγεθος του δείγματος και η συμπύκνωσή του, τα ρεολογικά του χαρακτηριστικά κ.ά..

Ωστόσο, λόγω του γεγονότος ότι η εκχύλιση με Soxhlet βασίζεται σε διαλύτες (ως επί το πλείστον σε ισχυρούς), συχνά απαιτεί προ-χώνευση με οξέα ενώ ταυτόχρονα είναι και χρονοβόρα, συνδυασμός που καθιστά τη θέση της στη σύγχρονη μεθοδολογία εκχύλισης αρκετά περιορισμένη. Επιπλέον, τα ακατέργαστα εκχυλίσματα σε πολλές περιπτώσεις πρέπει να υποβάλλονται είτε σε προκαταρκτική κλασματοποίηση ή και καθαρισμό ή σε κλασματοποίηση με χρήση διαλύτη ή/και διαμερισμό. Εξάλλου, σε άλλες περιπτώσεις, η διαδικασία διαβροχής πολλών σταδίων έχει μεγάλη κατανάλωση νερού και ενέργειας όπως επίσης και η υδατική απόσταξη γεγονός που δημιουργεί σοβαρές ανησυχίες στη σύγχρονη εποχή που αναζητά φιλικές προς το περιβάλλον λύσεις.

Άλλα σημαντικά μειονεκτήματα και περιορισμοί των συμβατικών τεχνικών εκχύλισης αποτελούν οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, η ανάγκη για διαλύτες υψηλής καθαρότητας, η απαίτηση εξάτμισης της τεράστιας ποσότητας διαλύτη, η χαμηλή απόδοση εκχύλισης, η επιλεκτικότητα αλλά και η θερμική αποσύνθεση των θερμικά ευαίσθητων συστατικών [187].

Για την αντιμετώπιση των κενών αλλά και των μειονεκτημάτων των συμβατικών τεχνικών που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν αναφερθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία και προταθεί νέες εναλλακτικές λύσεις, ελπιδοφόρες και μη συμβατικές όπως είναι οι σύγχρονες υποβοηθούμενες τεχνικές εκχύλισης (ενζυματικά EAE, υπερκρίσιμου υγρού SFE, μικροκυματικά υποβοηθούμενη MAE, υπερηχητικά υποβοηθούμενη UAE, υψηλής πίεσης υγρού PLE, μεταξύ άλλων) αλλά και άλλες όπως αυτές με χρήση ενζύμων ή βακτηρίων [312, 313, 335, 336, 330]. Επιπλέον, έχουν μελετηθεί και μέθοδοι με Παλλόμενα Ηλεκτρικά Πεδία, Υπερυψηλή Πίεση και Θερμικής Προκατεργασίας με Ωμικό Εναλλάκτη [378, 379, 380]. Οι περισσότερες από αυτές τις τεχνικές εκχύλισης θεωρούνται «πράσινες» [188], καθώς συμμορφώνονται με τα πρότυπα που θέτει ο Αμερικανικός Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA). Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, τα κύρια πλεονεκτήματα των νέων και μη συμβατικών τεχνικών εκχύλισης περιλαμβάνουν πιο φιλικές προς το περιβάλλον συνθήκες επεξεργασίας, μη χρήση επικίνδυνων χημικών ουσιών, χρήση ασφαλέστερων επικουρικών διαλυτών, χρήση νερού και ενεργειακή απόδοση,

μειωμένο σχηματισμό ανεπιθύμητων παραγώγων, χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, συνολικά οικονομικά αποδοτικότερο λόγο, υψηλότερη αποτελεσματικότητα, πρόληψη της αποικοδόμησης και αποφυγή περιττών βημάτων [187, 310, 311].

4.3 Σύγχρονες Μη-Συμβατικές Μέθοδοι Εκχύλισης Βιοδραστικών Ουσιών

4.3.1 Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού (ΕΥΥ)

Η ΕΥΥ αποτελεί την επιτομή μιας σημαντικής διαδικασίας πράσινης εκχύλισης που χρησιμοποιείται για τις βιοδραστικές ουσίες υψηλής αξίας όπως π.χ. χρωστικές και λιπαρά οξέα και εφαρμόζεται ευρέως τα τελευταία χρόνια [188]. Επίσης φαίνεται ότι η ΕΥΥ αντιμετωπίζει τα κύρια μειονεκτήματα των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης όπως αυτά που σχετίζονται με το μεγάλο χρόνο εκχύλισης, την υψηλή κατανάλωση ενέργειας και την παραγωγή αποβλήτων [188, 189]. Εκτός αυτού, οι συμβατικές τεχνικές περιορίζονται στην επιλεκτικότητα της εκχύλισης ενώ στη συνέχεια απαιτούνται βήματα καθαρισμού για την απομόνωση των βιοδραστικών μεταβολιτών ενδιαφέροντος [190, 191]. Αντίθετα, η ΕΥΥ παρουσιάζει μεγάλη επιλεκτικότητα εκχύλισης, σύντομους χρόνους επεξεργασίας και χαμηλό κίνδυνο αποικοδομησιμότητας του εξαγόμενου προϊόντος [192, 193, 194], χωρίς τη χρήση διαλυτών μη ανθρώπινης διατροφικής ποιότητας [195].

Η ΕΥΥ χρησιμοποιεί υπερκρίσιμα υγρά, τα οποία πάνω από το κρίσιμο σημείο τους παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υγρών όπως η διαλυτική ισχύς και αμελητέα επιφανειακή τάση κ.λπ., καθώς και χαρακτηριστικά αερίων, όπως βελτιωμένες ιδιότητες μεταφοράς [196]. Επιπλέον, η ΕΥΥ απαιτεί ελάχιστες ποσότητες σε διαλύτες σε σύγκριση με άλλες τεχνικές εκχύλισης, ενώ έχει ευρεία εφαρμογή σε ποικίλες βιοδραστικές ενώσεις [197, 317].

Οι θερμοδυναμικές ιδιότητες και οι ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) το καθιστούν τον προτιμώμενο διαλύτη για διεργασίες εκχύλισης με βάση την ΕΥΥ [193, 198]. Αρκετά άλλα χαρακτηριστικά όπως η μη τοξική φύση του, η χημική αδράνεια, η μη ευφλεκτότητα, η συνολικά οικονομικά αποδοτικότητά του, η ευκολία και η επάρκεια στη διαθεσιμότητά του και η φιλικότητα προς το περιβάλλον αντιπροσωπεύουν επίσης σημαντικούς παράγοντες που ευνοούν την

επιλογή του CO₂ ως διαλύτη EYY [193, 199, 200]. Διαθέτει επίσης άλλα πλεονεκτήματα, όπως ένα χαμηλό κρίσιμο σημείο (31 °C, 73 bar).

Πέρα από την κρίσιμη κατάστασή του, το CO₂ αποκτά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά κάπου μεταξύ εκείνων ενός αερίου και ενός υγρού, που παρουσιάζουν παρόμοια ιξώδη, μέση διαχυτικότητα και υψηλή πυκνότητα ενισχύοντας τη διείσδυσή του σε υλικά [197, 201, 318]. Επιπλέον, η πολικότητα του CO₂ μπορεί να διαμορφωθεί με τη χρήση συν-διαλυτών όπως η αιθανόλη, αυξάνοντας τις αποδόσεις εκχύλισης πολικών ενώσεων [202, 203].

Οι συνδυασμοί παραμέτρων (θερμοκρασία, πίεση και συν-διαλύτης) είναι απαραίτητοι για την αποτελεσματική εκχύλιση μιας ένωσης-στόχου. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται συχνά πειραματικά σχέδια, όπως η μέθοδος Taguchi, ιδίως για την αξιολόγηση διαφόρων παραγόντων διεργασίας κάθε φορά με ελάχιστο αριθμό πειραματικών κύκλων (ορθογώνια συστοιχία) [204, 205]. Ωστόσο, καθώς η σύνθεση του εκχυλίσματος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες εισόδου της πίεσης, της θερμοκρασίας και της ροής συν-διαλύτη, τα προγνωστικά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσέγγιση των ορθών τιμών εισόδου ώστε να έχουμε επιθυμητή έξοδο τόσο ως προς την ανάκτηση όσο και ως προς τα χαρακτηριστικά του εκχυλίσματος [188].

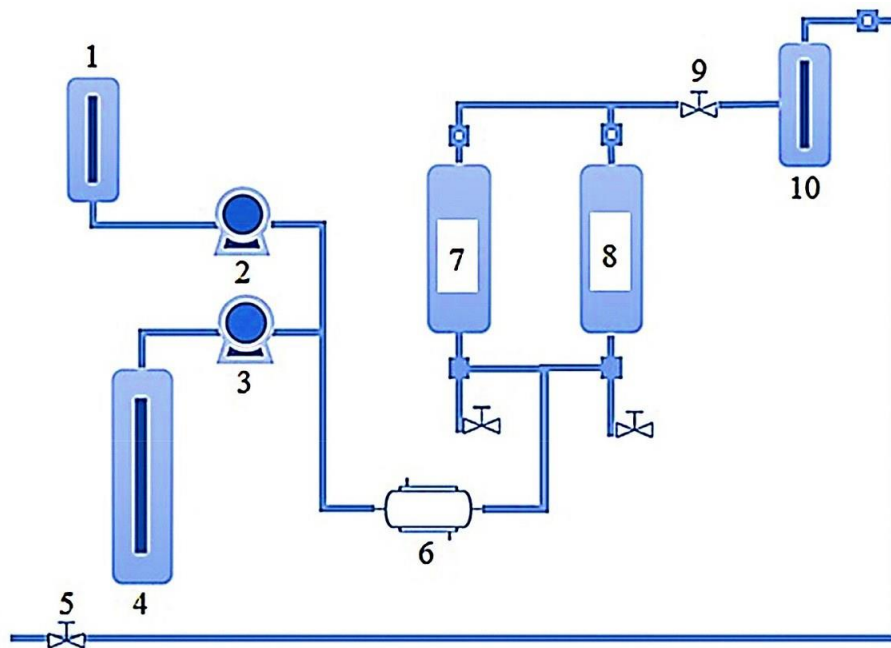
Παρά τις δυνατότητες αυτής της τεχνικής, η χρησιμότητά της για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από πηγές με βάση τα μικροφύκη εξαρτάται σε μεγάλη βαθμό από τον τύπο των ενώσεων που πρόκειται να εξαχθούν. Ο Mendiola et al. χρησιμοποίησε EYY για να απομονώσει ένα εκχύλισμα πράσινων μικροφυκών, δηλ., *Dunaliella salina* παρουσία CO₂ στα 314 bar και 9,8 °C [178, 206]. Το εκχύλισμα της *D. salina* που ελήφθη εμφάνισε αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση κατά του *Escherichia Coli*, του σταφυλόκοκκου *Aureus*, των *Candida albicans* και του *Aspergillus niger* και σύμφωνα με τους συγγραφείς, αυτό οφειλόταν πιθανώς στην παρουσία ινδολικών ενώσεων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) και ενώσεων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της καροτίνης, όπως η β-ιονόνη και το νεοφτυδιένιο στο εκχύλισμα του μικροάλγους. Επίσης, άλλες βιοδραστικές ενώσεις, όπως η βιταμίνη E και τα καροτενοειδή, μεταξύ άλλων, έχουν εξαχθεί από φύκη με EYY. Η βιταμίνη E έχει εκχυλιστεί με EYY σε πιλοτική κλίμακα από *Spiulina platensis* [207, 208]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο εμπλουτισμός τοκοφερόλης πάνω από 12

φορές από την αρχική συγκέντρωση στην πρώτη ύλη με εκχύλιση με καθαρό CO₂ στα 361 bar και 83,3 °C. Τέλος, άλλες βιοδραστικές ενώσεις-στόχοι, όπως οι διολεφίνη, έχουν εξαχθεί με EYY από τα κύτταρα *Botryococcus braunii* [209].

Σχηματικό Διάγραμμα Ροής EYY

Στο παρακάτω Σχήμα 3 παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση του εξοπλισμού EYY καθώς και των συνθηκών εργασίας. Η ροή εργασίας EYY για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από θαλάσσιες πηγές περιλαμβάνει διάφορες παραμέτρους όπως για παράδειγμα, τύπο διαλύτη, θερμοκρασία, πίεση, αλλά και τη σύνθεση του δείγματος, την συγκέντρωση, την ποσότητα δείγματος, το μέγεθος σωματιδίων του δείγματος, τους παράγοντες διασκορπισμού κ.ά. Μεταξύ όλων, η ρευστοδυναμική του υπερκρίσιμου υγρού έχει την πλέον ισχυρή επίδραση που σχετίζεται με τη διαλυτότητα των βιοδραστικών ενώσεων-στόχων. Αυτό αλλάζει επίσης σε σχέση με τη θερμοκρασία και την πίεση εκχύλισης. Επιπλέον το βέλτιστο μέγεθος δείγματος συμβάλλει σημαντικά στην υψηλότερη απόδοση εκχύλισης και τελικά ενισχύει τη συνολική σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της διαδικασίας ενώ η αυτή παραμένει φιλική με το περιβάλλον [320].

Όπως φαίνεται λοιπόν στο Σχήμα 3, ο εξοπλισμός EYY περιλαμβάνει τα ακόλουθα εξαρτήματα / μέρη: (1) μια δεξαμενή (μερικές φορές ονομάζεται επίσης δοχείο συν-διαλύτη) που περιέχει την κινητή φάση, (2) αντλία που συμπιέζει την κινητή φάση, (3) αντλία που πιέζει το αέριο (CO₂), (4) δεξαμενή αερίου (CO₂), (5) χειροκίνητος ρυθμιστής πίεσης (BPR), (6) εναλλάκτης θερμότητας, (7) δοχείο εκχύλισης, (8) δοχείο εκχύλισης, (9) αυτοματοποιημένος ρυθμιστής σταθερής πίεσης BPR και (10) δοχείο συλλογής. Η διαδικασία της EYY μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους: (1) δυναμική λειτουργία, (2) στατικός τρόπος ή (3) κάποιο συνδυασμό και των δύο τρόπων [188, 319].



Σχήμα 3. Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού EYY (Αναπαράχθηκε από τον García-Pérez et al. [188], με άδεια του Elsevier)

4.3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE)

Η MAE είναι μια άλλη μοναδική προσέγγιση που παράγει εκχυλίσματα υψηλής ποιότητας και προστιθέμενης αξίας βιολογικές ενώσεις βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης με διαλύτες, η MAE, όντας φιλική προς το περιβάλλον, έχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως οι σχετικά εύκολες συνθήκες λειτουργίας, η ελάχιστη χρήση διαλυτών και μάλιστα μη διαβρωτικών, η σύντομη διάρκεια εκχύλισης, η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας για αύξηση θερμοκρασίας ενώ αναστέλλει την αποικοδόμηση των θερμο-ασταθών ενώσεων [210, 211, 314].

Ως εκ τούτου, η MAE χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες βιομηχανικές πρακτικές για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων υψηλής αξίας, φυτοθρεπτικών συστατικών, λειτουργικών τροφίμων και δραστικών συστατικών φαρμακευτικής ποιότητας από βιοϋλικά [188, 193, 218, 219, 220]. Παρά το γεγονός ότι τα μικροκύματα αποτελούν γνωστή παραγωγική πηγή βιοδραστικών ενώσεων, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν σχετικά περιορισμένες αναφορές σχετικά με τη χρήση της MAE για εκχύλιση ενώσεων όπως αλκαλικά γαλακτάκτινα, καραγενάνη και άγαρ από φύκη και άλλες πηγές μικροφυκών [213, 214, 215, 216, 217]. Για παράδειγμα, ο Rodriguez-Jasso et al.

χρησιμοποίησε την λύση της ΜΑΕ για να εκχυλίσει τους θειωμένους πολυσακχαρίτες (φουκοϊδάνη) από τα καφέ φύκια, όπως αυτά του είδους *Fucus vesiculosus* [216]. Με στόχο την επίτευξη μέγιστων αποδόσεων εκχύλισης, αξιολογήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν πολλές παράμετροι όπως η πίεση (30-120 psi), ο χρόνος εκχύλισης (1-31 λεπτά) και η αναλογία φυκών/νερού (1/25 έως 5/25 g/mL). Επίσης, σε κάθε πειραματική συνθήκη αξιολογήθηκαν, η αποικοδόμηση των φυκών (%), η συνολική απόδοση ζάχαρης (%), και η περιεκτικότητα σε SO₃ (%).

Η χρήση διηλεκτρικής θέρμανσης μέσω μικροκυμάτων (MW) σε αναλυτικά εργαστήρια ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Η ενέργεια μικροκυμάτων για εκχύλιση περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1986 [275]. Η ΜΑΕ παράγει κύματα υψηλής συχνότητας (που κυμαίνονται από 300 MHz (100 cm) έως 300 GHz (0,1 cm)) με μήκη κύματος 0,001-1 m [276]. Η χρήση μικροκυμάτων για εκχύλιση είναι όταν η ακτινοβολία μικροκυμάτων εφαρμόζεται σε συχνότητα κοντά στα 2,45 GHz (12 cm), προκαλώντας διηλεκτρική θέρμανση κυρίως με απορρόφηση της ενέργειας στο νερό και σε άλλες πολικές ενώσεις διαθέσιμες σε υγρή βιομάζα ή σε δεδομένο δείγμα [190].

Η θέρμανση μέσω μικροκυμάτων προκύπτει από τη διάχυση ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων στο ακτινοβολημένο μέσο. Οι διηλεκτρικές ιδιότητες και το μέσο ηλεκτρικό πεδίο επηρεάζουν τη διαχέουσα ισχύ. Τα μικροκύματα προκαλούν τη δόνηση του νερού και άλλων πολικών μορίων μέσα στην υγρή βιομάζα, με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας στα ενδοκυτταρικά υγρά, γεγονός που προκαλεί στη συνέχεια την εξάτμιση του νερού και την άσκηση πίεσης στα κυτταρικά τοιχώματα που οδηγεί σε κυτταρική διάσπαση [278].

Επιπλέον, τα μικροκύματα διασπών τους δεσμούς υδρογόνου και ενεργοποιούν τη μετανάστευση διαλυμένων ιόντων, διευκολύνοντας την αυξημένη διείσδυση διαλύτη στο δείγμα [277]. Η υψηλότερη διηλεκτρική σταθερά του νερού εξασφαλίζει ότι η θερμική ενέργεια μεταφέρεται στα κυτταρικά τοιχώματα πιο αποτελεσματικά με θέρμανση μέσω μικροκυμάτων [279]. Σε αντίθεση με τη συμβατική θέρμανση, η θέρμανση μικροκυμάτων δεν περιορίζεται από τη θερμική αγωγιμότητα ή τα θερμικά ρεύματα μεταφοράς, επιτρέποντας έτσι ταχύτερη αύξηση της θερμοκρασίας. Η μέγιστη θερμοκρασία του υλικού που θερμαίνεται με μικροκύματα εξαρτάται από το ρυθμό απώλειας θερμότητας και την ισχύ που εφαρμόζεται [280].

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι εφαρμογής μικροκυμάτων: κλειστού και ανοιχτού δοχείου. Τα συστήματα κλειστών δοχείων βασίζονται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία και πίεση, ενώ στα συστήματα ανοιχτών δοχείων, μόνο το τμήμα του δοχείου εκχύλισης που περιέχει το δείγμα επιδέχεται την ακτινοβολία μικροκυμάτων [281]. Πρόσφατα, υιοθετήθηκε υδατο-απόσταξη μικροκυμάτων χωρίς διαλύτες (SFME) για εργαστηριακές εφαρμογές για την εκχύλιση αιθέριων ελαίων από διάφορα φυτά και φρούτα ως φιλική προς το περιβάλλον και βιώσιμη εναλλακτική λύση αλλά μέχρι σήμερα, αυτό δεν έχει εφαρμοστεί για τη μικροαλγινική βιοτεχνολογία [280].

Η SFME χρησιμοποιεί θέρμανση μικροκυμάτων και απόσταξη σε ατμοσφαιρική πίεση, όπου χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι εκπέμπεται λιγότερο CO₂ στην ατμόσφαιρα (200g CO₂/g αιθέριου ελαίου σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους που έχουν εκπομπή 3600g CO₂/g αιθέριου ελαίου) [282]. Η μικροκυματική υδροδιάχυση και η βαρύτητα (MHG) συνδυάζουν τη θέρμανση μικροκυμάτων και τη γήινη βαρύτητα στην ατμοσφαιρική πίεση επιτρέποντας την εκχύλιση αιθέριων ελαίων χωρίς απόσταξη και εξάτμιση που αποτελούν τις πλέον ενεργοβόρες διεργασίες μεταξύ των εργασιών μιας λειτουργικής παραγωγικής μονάδας [283, 284]. Υπάρχουν διάφοροι βασικοί λειτουργικοί παράγοντες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μικροκυμάτων, όπως τα είδη των μικροάλγων, η ισχύς των μικροκυμάτων, η θερμοκρασία και οι ιδιότητες και ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιούνται [276].

Χαρακτηριστικές εφαρμογές της MAE είναι η χρήση της για την παραγωγή υψηλής αξίας λιπιδίων (EPA και DHA) τα οποία χρησιμοποιούνται στις φόρμουλες των παιδικών και βρεφικών τροφών καθώς και σημαντικών, υψηλής αξίας χρωστικών όπως η χλωροφύλλη και τα καροτονοειδή. Αντιλαμβανόμαστε εύκολα την τεχνική δυσκολία που έχουμε να αντιμετωπίσουμε με τη εκχύλιση των χρωστικών, οι οποίες είναι ιδιαίτερα ασταθείς και οξειδώνονται, οπότε πρέπει να επιλεχθούν μέθοδοι ανάκτησης πολύ ήπιων συνθηκών που ταυτόχρονα ωστόσο εκχυλίζουν αποτελεσματικά. Στον παρακάτω πίνακα 13 δίνονται χαρακτηριστικές συνθήκες εκχύλισης χρωστικών από μικροάλγη καθώς και τα ποσοστά ανάκτησης [290, 291, 292, 293, 294, 295, 296].

Πίνακας 13. Χρωστικές που Εκχυλίζονται με MAE[285]

Μικροφύκος	Ξηρή/Υγρή Μέθοδος	Διαλύτης	Αναλογία Διαλύτη στο διάλυμα	Προστιθέμενες Ποσότητες	Ρυθμίσεις Μικροκυμάτων	Προϊόν και Απόδοση
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Dry	Ethanol:ethyl alcohol	49:1	9,81 mL solvent 200 mg algae powder	141W, 5 min 30 s	0.59% DW astaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Dry	(2:1)	100:1	0.1 g algae, 10 mL acetone	2.45 GHz, 60% of 1200W output, 75 °C, 5min	74% astaxanthin recovery
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Dry	Acetone	600:1	50 mg algae, 30 mL acetone	50W, 56 °C, 1 bar, 3–5 min	0.12% DW - carotene;0.42% DW fucoxanthin
<i>Cylindrotheca closterium</i>						0.45% DW chlorophyll-a;
<i>Arthrospira platensis</i>	Dry	Methanol:ethyl acetate:light petroleum (1:1:1)	16,7:1	20 g power (milled with mortar and pestle)	400W, 70 °C, 1 bar, 15 min	4.27% DW fatty acids 0.063% DW carotenoids
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Dry	Acetic ether	100:1	5 g algae, 500 mL solvent, 10 mL distilled water, 10 mL n-hexane	2.45 GHz, 45 °C, 30 min	7.96 mg/100 mg astaxanthin (36.88% yield)
<i>Arthrospira platensis</i>	X	Ethanol:ammonium acetate (10 mM) (4:1)	X	X	400W, 60 °C, 1 bar, 15 min	0.014% DW - carotene
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Dry	Ethanol	20:1	0.5 g algae, 10 mL ethanol	2.45 GHz, 850 W, 30 °C, 2 min	4.51% DW carotenoids & 0.46% DW fucoxanthin (32.26% recovery)

x όταν δεν έχουμε διαθέσιμες ή δημοσιευμένες πληροφορίες

Επίσης, στον παρακάτω πίνακα 14 δίνονται οι συνθήκες καθώς και το ποσοστό ανάκτησης λιπαρών από μικροφύκη με τη χρήση της MAE [297, 298, 299, 300, 301, 302, 303].

Πίνακας 14. Λιπαρά που Εκχυλίζονται με MAE για παραγωγή βιοντήζελ[285]

Μικροφύκος	Ξηρή/Υγρή Μέθοδος	Διαλύτης	Αναλογία Διαλύτη στο διάλυμα	Προστιθέμενες Ποσότητες	Ρυθμίσεις Μικροκυμάτων	Προϊόν και Απόδοση
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Dry	Methanol:chloroform (1:2)	X	1 g of algae	2.45 GHz, 1100W(70% power), 60 C, 5 min (cycle mode: 21 s on, 9 s off)	32% biodiesel
<i>Nannochloropsis salina</i>	Dry	Methanol	1:9	2 g algae, 24 mL methanol, 2% KOH catalyst	2.45 GHz, 800 W(50% power), 60–64 C, 6 min	80.13% FAMES
<i>Nannochloropsis salina</i>	Dry	Methanol	1:15	3% KOH catalyst	1400W, 1400W, 10 min	40.03% DW FAMES
<i>Nannochloropsis salina</i>	Dry	Ethanol	9:1	2 g algae, 18 mL ethanol	1400W reduced to 800 W, 245–285 C, 65–80 bar, 30 min	30.9% DW FAMES
<i>Chlorella sp.</i>	Dry	Ethanol	12:1	4 g algae, 48 mL ethanol and 2% NaOH catalyst	700W(50% power), 78 C, 6 min	17.11% DW FAMES
Mixed microalgal culture	Dry	Methanol	8:1	5 g algae, KFCaO catalyst, 40 mL methanol	2.45 GHz, 10–80 W, 60 C, 45 min	58.12% biodiesel
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Dry	Methanol	12:1	5 g algae, 60 mL methoxide, 2% NaOH catalyst in methanol	2.45 GHz, 800 W, 1 bar, 4 min	52% biodiesel conversion efficiency

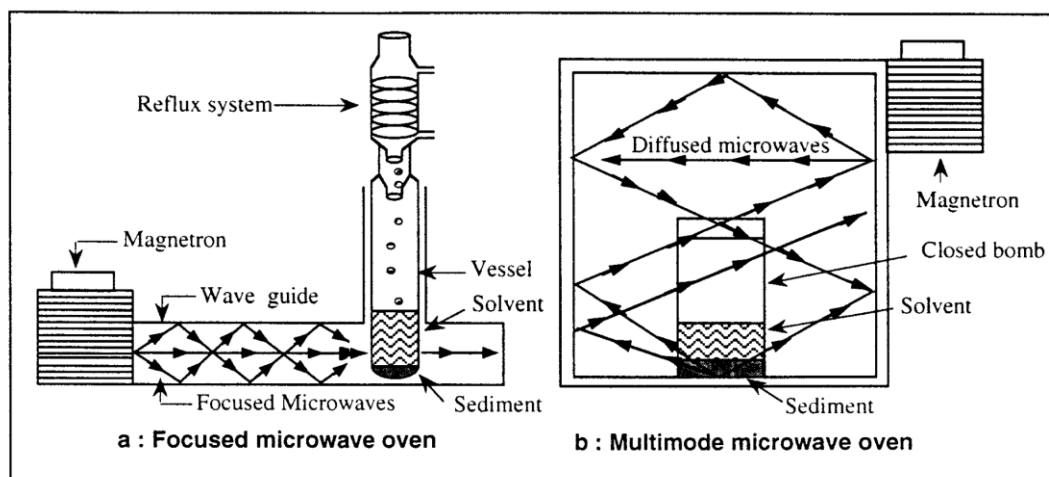
x όταν δεν έχουμε διαθέσιμες ή δημοσιευμένες πληροφορίες

Σχηματικό Διάγραμμα Ροής εργασίας της MAE

Στα συστήματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα (microwave assisted extraction, MAE), χρησιμοποιείται ακτινοβολία μικροκυμάτων, η οποία προκαλεί την κίνηση των πολικών μορίων και την περιστροφή διπόλων σε θερμαινόμενους διαλύτες [221]. Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό της MAE ωθεί προς την αποτελεσματική μεταφορά των ενώσεων-στόχων από το δείγμα στον διαλύτη [314, 316].

Το διάγραμμα ροής της MAE ξεκινά με την ομογενοποίηση των δειγμάτων τα οποία στη συνέχεια αναμειγνύονται με διαλύτη. Όσον αφορά στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, η τεχνική MAE είναι πολύ ευέλικτη λόγω της δυνατότητας χρήσης πολυάριθμων διαλυτών όπως ακετόνη, ακετονιτρίλη, αιθανόλη, μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο, με διαφορετικούς δείκτες πολικότητας. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε ασφαλή θάλαμο και ακτινοβολούνται με μη ιονιζόμενη ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας άνω των 2000 MHz για σύντομο χρονικό διάστημα. Η περίοδος ακτινοβολίας επαναλαμβάνεται συνήθως αρκετές φορές με διαδοχικές περιόδους ψύξης για να αποφευχθεί ο βρασμός του δείγματος.

Σύμφωνα με τη φυσική, γενικότερα, και τη θεωρία μικροκυμάτων, ειδικότερα, τα μικροκύματα αποτελούνται από δύο κάθετα πεδία ταλάντωσης, δηλαδή (1) ένα ηλεκτρικό πεδίο και (2) ένα μαγνητικό πεδίο. Το ηλεκτρικό πεδίο θεωρείται υπεύθυνο για το φαινόμενο της θέρμανσης [222].



Σχήμα 4. Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού MAE (a: προσανατολισμένης ακτινοβολίας b: πολυλειτουργικής ακτινοβολίας)

Επιπλέον, η αρχή της θέρμανσης διέπεται από δύο φαινόμενα, δηλαδή (1) περιστροφή δίπολου και (2) ιοντική αγωγιμότητα [222, 223, 224]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, και οι δύο συμβαίνουν ταυτόχρονα, και η θέρμανση από τα μικροκύματα έχει άμεσο αντίκτυπο στην πολικότητα των υλικών/διαλυτών δοκιμής [223].

Συνοπτικά, λόγω του υψηλού επιπέδου υγρασίας, οι θαλάσσιες πηγές είναι εξαιρετικά υποψήφια υλικά για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με τη χρήση ΜΑΕ. Αυτό συμβαίνει επειδή η περιεχόμενη υγρασία χρησιμεύει ως ο κύριος στόχος για θέρμανση μέσω μικροκυμάτων. Ως έχουμε αναφέρει, κατά τη θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων, η υγρασία εξατμίζεται και παράγει τεράστια ποσότητα πίεσης η οποία τελικά διασπά τις εξωτερικές κυτταρικές μεμβράνες και διευκολύνει την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων [223]. Ο εξοπλισμός ΜΑΕ περιλαμβάνει τέσσερα κύρια κατασκευαστικά στοιχεία, δηλαδή (1) γεννήτρια μικροκυμάτων· (2) ένας οδηγό κυμάτων που χρησιμοποιείται για την μεταφορά των μικροκυμάτων από την πηγή στην κοιλότητα μικροκυμάτων· (3) το θάλαμο επώασης του δείγματος· και (4) κυκλοφορητή που επιτρέπει στα μικροκύματα να κινούνται μόνο προς τα εμπρός

4.3.3 Εκχύλιση υπό πίεση-υγρού (Pressurized-Liquid Extraction, PLE)

Τα τελευταία χρόνια, το PLE θεωρείται εξαιρετική τεχνική για την εξαγωγή πολικών ενώσεις, σε σύγκριση με άλλες συμβατικές στρατηγικές εκχύλισης [225]. Το 1996, ο Richter et al παρουσίασε την επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction, ASE) ως μια νέα τεχνική για την προετοιμασία δειγμάτων αλλά και για την εκχύλιση ενώσεων υψηλής αξίας συνδυάζοντας αυξημένες θερμοκρασίες και πιέσεις με υγρούς διαλύτες [226]. Με δεδομένες τις ποικίλες συνθήκες εφαρμογής, η ASE είναι επίσης ευρύτερα γνωστή ως εκχύλιση υγρού υπό πίεση (PLE), εκχύλιση ρευστών υπό πίεση (Pressurized Fluid Extraction, PFE), ενισχυμένη εκχύλιση με διαλύτη (Enhanced Solvent Extraction, ESE) ή/και εκχύλιση διαλύτη υψηλής πίεσης (High Pressure Solvent Extraction, HPSE) [227].

Όπως και άλλες πράσινες μέθοδοι εκχύλισης, η PLE έχει επίσης πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις. Ειδικότερα, η ελάχιστη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, και ο χαμηλότερος απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης της PLE ανταποκρίνονται απόλυτα στην πράσινη ατζέντα που τις αρχές της Πράσινης Χημείας και της Μηχανικής (Green Chemistry and Engineering, GCE) [228]. Σύμφωνα με τους όρους της GCE, η PLE έχει χρησιμοποιείται με επιτυχία για την εκχύλιση

βιοδραστικών φυσικών προϊόντων από θαλάσσια σφουγγάρια και άλλα φυσικά υλικά [225, 228].

Επίσης, πολύ πρόσφατα, ο Otero et al. χρησιμοποίησε την τεχνική PLE για να εκχυλίσει τα υψηλής αξίας λιπαρά οξέα από είδη μικρο και μακροφυκών από τα βορειοδυτικά της Ισπανίας, όπως, *Ulva intestinalis*, *Ulva lactuca*, *Fucus vesiculosus*, *Dictyota dichotoma*, *Cystoseira baccata* and *Himanthalia elongata* [229]. Το προφίλ της περιεκτικότητας σε λιπίδια (%) και η σύνθεση λιπαρών οξέων (mg/g) τεσσάρων καφέ ειδών μικροαλγών (*F. vesiculosus*, *D. dichotoma*, *C. baccata* και *H. elongata*) και δύο πράσινων φυκών (*U. intestinalis*, *U. lactuca*) προσδιορίστηκαν και κυμαίνονταν από 4,6% έως 6,7% (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Περιεκτικότητα σε λιπίδια (%) και σύνθεση λιπαρών οξέων (mg/g) έξι ειδών φυκών (ξηρό βάρος) (229/88)

FA	FA (C:U)	RT (min)	<i>F. vesiculosus</i>	<i>C. baccata</i>	<i>H. elongata</i>	<i>D. dichotoma</i>	<i>U. lactuca</i>	<i>U. intestinalis</i>
FA content (mg/g algae)	FA 14:0	9.802	11.09 +/- 0.19	5.13 +/- 0.12	1.72 +/- 0.04	3.01 +/- 0.37	1.78 +/- 0.22	1.96 +/- 0.23
	FA 15:0	10.774	0.31 +/- 0.03	ND	0.17 +/- 0.03	ND	0.18 +/- 0.02	0.08 +/- 0.00
	FA 16:1	11.789	0.98 +/- 0.22	2.19 +/- 0.04	0.56 +/- 0.01	1.16 +/- 0.05	0.16 +/- 0.00	0.16 +/- 0.00
	FA 16:0	12.078	9.64 +/- 0.30	6.80 +/- 0.29	5.85 +/- 0.14	4.40 +/- 0.64	6.09 +/- 0.29	6.02 +/- 0.22
	FA 18:3	14.900	0.08 +/- 0.00	ND	0.04 +/- 0.04	ND	0.09 +/- 0.01	ND
	FA 18:2	15.304	0.34 +/- 0.04	0.16 +/- 0.02	0.01 +/- 0.00	0.01 +/- 0.00	0.05 +/- 0.01	0.06 +/- 0.00
	FA 18:1	15.507	13.15 +/- 1.03	3.09 +/- 0.34	0.49 +/- 0.09	1.09 +/- 0.05	0.47 +/- 0.02	0.23 +/- 0.01
	FA 18:0	16.041	1.56 +/- 0.13	1.65 +/- 0.16	1.80 +/- 0.04	1.28 +/- 0.07	1.68 +/- 0.11	2.11 +/- 0.08
	FA 20:4	20.549	1.30 +/- 0.12	0.62 +/- 0.01	ND	ND	ND	ND
	FA 20:5	20.806	0.36 +/- 0.08	0.24 +/- 0.01	ND	0.15 +/- 0.03	ND	ND
FA total (mg/g algae)			38.83	19.87	10.64	11.09	10.46	10.63
Lipid content by Folch (%)			6.6%	6.7%	6.0%	5.7%	4.8%	4.6%

Τα λιπίδια εξήχθησαν με τη μέθοδο Folch (n = 3). Περιλαμβάνεται ο (C:U) αριθμός άνθρακα σε αναλογία πολυακόρεστων και ο χρόνος κατακράτησης (RT) των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES). Τα αποτελέσματα δείχνουν το μέσο πρότυπο σφάλμα του μέσου (SEM) τριών πειραμάτων. N.D. σημαίνει ότι δεν ανιχνεύτηκε. Αναπαράγεται από τον Otero et al. [88], ένα άρθρο ανοικτής πρόσβασης που διανέμεται σύμφωνα με τους όρους και τις προϋποθέσεις της κατανομής δημιουργικών κοινών (CC BY) άδεια χρήσης (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Σε προηγούμενη μελέτη, η Shang et al. εξήγαγε φουκοξανθίνη από καφέ φύκη, όπως τα *Eisenia bicyclis*, χρησιμοποιώντας την PLE [230]. Στην περίπτωση αυτή υιοθετήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας και των σημαντικών μεταβλητών. Αρχικά, ένα σχέδιο Plackett-Burman (PBD) χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει τους έξι σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν, δηλαδή τη θερμοκρασία (°C), τη συγκέντρωση αιθανόλης (%), τον στατικό χρόνο (min), την πίεση (psi), το βάρος

δείγματος (g) και τον όγκο έκπλυσης (%). Μετά από αυτό, ένας δεύτερος σχεδιασμός, όπως για παράδειγμα ένας κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός, χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω βελτιστοποίηση και την επίτευξη των καλύτερων από τους επιλεγμένους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία (°C) και η συγκέντρωση αιθανόλης (%) ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη και αποδοτικότερη εκχύλιση και ανάκτηση φουκοξανθίνης.

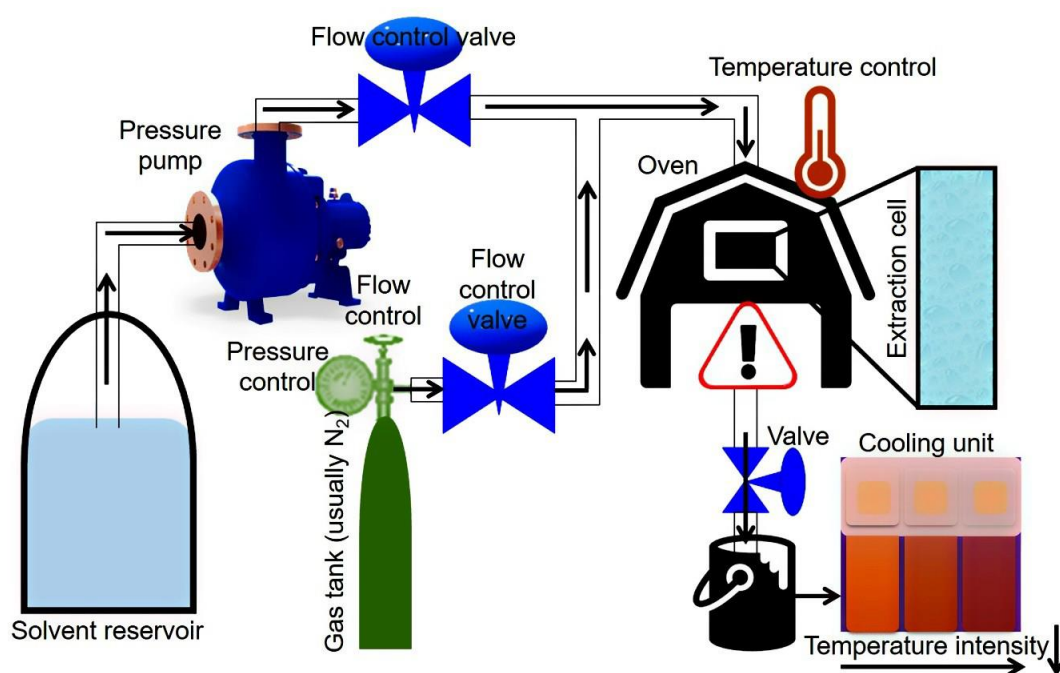
Η Anaëlle et al. πραγματοποίησε διαφορετικά πειράματα εκχύλισης PLE μαζί με άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως φυγοκεντρική εκχύλιση διαχωριστικού (Centrifugal Partition Extraction, CPE) και εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluid Extraction, SFE) για την εξαγωγή βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων από καφέ μακροφύκη χρησιμοποιώντας το *muticum Sargassum* ως μοντέλο [231]. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η χρήση της PLE για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με βάση τα φύκια έχει τεράστιες δυνατότητες και οι εφαρμογές αναμένεται να συνεχίσουν να αυξάνονται τα επόμενα χρόνια.

Σχηματικό Διάγραμμα Ροής της PLE

Όπως και στην εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE), οι διαδικασίες εκχύλισης που βασίζονται στην PLE μπορούν επίσης να γίνουν σε δύο τρόπους, την στατική ή τη δυναμική λειτουργία. Η στατική λειτουργία χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της εύκολης διαθεσιμότητας στην αγορά του εξοπλισμού σε σύγκριση με τη δυναμική λειτουργία. Στην PLE, η υψηλότερη ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να επιτευχθεί βελτιστοποιώντας ορισμένες κρίσιμες παραμέτρους. Για παράδειγμα, οι σημαντικότερες παράμετροι που μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην ανάκτηση του προϊόντος περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, την πίεση, τον διαλύτη εκχύλισης, τον στατικό χρόνο και τον αριθμό των κύκλων επανάληψης. Άλλες παράμετροι όπως ο χρόνος εκκαθάρισης και ο όγκος έκπλυσης έχουν μικρή επιρροή στην τελική ανάκτηση, οπότε αυτές συνήθως διατηρούνται σταθερές. Κάθε παράμετρος μπορεί να βελτιστοποιηθεί χωριστά ή χρησιμοποιώντας πειραματικούς σχεδιασμούς [227]. Ορισμένες άλλες παράμετροι, όπως η διάταξη του δείγματος εντός του δοχείου εκχύλισης καθώς και η συλλογή των αναλυτών θα πρέπει επίσης να θεωρούνται σημαντικά ανάλογα με την ένωση-στόχο. Φυσικά, για την ανάκτηση εξαιρετικά πτητικών ουσιών θα πρέπει να περιλαμβάνεται και ένα στάδιο ψύξης.

Στο σχήμα 5 παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση του εξοπλισμού PLE καθώς και των συνθηκών εργασίας. Κυρίως, το σύστημα εκχύλισης της PLE περιλαμβάνει μια

σειρά ταμιευτήρων (δεξαμενών) διαλυτών που είναι συνδεδεμένα με αντλία υψηλής πίεσης. Μια δεξαμενή αερίου (συνήθως αζώτου, N_2) και μια δεξαμενή διαλύτη ακολουθούν την αντλία πίεσης, και στη συνέχεια και οι δύο συνδέονται με ένα φούρνο. Βαλβίδες ελέγχουν τη ροή διαλύτη και αερίου στον θάλαμο εκχύλισης που τοποθετείται μέσα στο φούρνο, το καθένα ξεχωριστά, για να διατηρήσει την πίεση μέσα στο σύστημα. Το εξαγόμενο προϊόν συλλέγεται στο τέλος της εξόδου του συστήματος εκχύλισης και επιπλέον μπορεί επίσης να αντλείται προς την μονάδα ψύξης για ταχεία ψύξη του παραγόμενου εκχυλίσματος.



Σχήμα 5. Σχηματικό Διάγραμμα Ροής του εξοπλισμού PLE και των συνθηκών εργασίας.

4.3.4 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Ένζυμα (Enzyme-Assisted Extraction, EAE)

Όπως και οι άλλες προαναφερθείσες νέες και πράσινες διαδικασίες εκχύλισης έτσι και η EAE βιοδραστικών ενώσεων από πολλές και ποικίλες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων, έχει λάβει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Σε σύγκριση με άλλες αναφερόμενες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, η EAE προσφέρει κάποια αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα όπως: (1) υψηλή επιλεκτικότητα, (2) συνολική αποτελεσματικότητα, (3) ταχεία εκχύλιση, (4) φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες,

(5) χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, (6) ελάχιστη χρήση επικίνδυνων ή πολύ δραστικών χημικών ουσιών, (7) μέγιστη απόδοση, (8) χαμηλή έως καθόλου απαίτηση βημάτων προστασίας/αποπροστασίας, (9) διευκόλυνση της ανάκτησης και (10) ανακυκλωσιμότητα διεργασίας [220, 232, 233, 234].

Επιπλέον, οι ενζυμικές προεπεξεργασίες βοηθούν επίσης στην προαγωγή των φαινομένων μεταφοράς και τελικά διευκολύνεται η απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών με αποτελεσματικό τρόπο [235]. Μια σειρά ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των λιγνινολυτικών, κυτταρινολυτικών, και πρωτεϊνολυτικών ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως τέλειοι καταλύτες. Η ενζυματική προεπεξεργασία ή η κατάλυση προκαλεί εύκολα τη διάσπαση ή/και την υδρόλυση σύνθετων υλικών στα κυτταρικά τοιχώματα και μεμβράνες, υποστηρίζοντας έτσι και την ανάκτηση ενδοκυττατικών βιοδραστικών συστατικών που δεν εύκολα εκχύλισμα μέσω συμβατικών μεθόδων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ενδοκυτταρικά βιοδραστικά συστατικά είναι γενικά ανθεκτικά και περικλεισμένα σε αλυσίδες πολυσακχαριτών-λιγνίνης, με συνέπεια την περιορισμένη δυνατότητα εξαγωγής [220].

Η παρουσία σύνθετων πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα των φυκών της θαλάσσιας γλωρίδας, όπως αλγινικά άλατα και καραγενάνη, δημιουργούν φυσικούς φραγμούς και μειώνουν την αποτελεσματικότητα εκχύλισης των κλασικών μεθόδων. Η ΕΑΕ ως προσέγγιση εκχύλισης έχει μοναδικές δυνατότητες να ξεπεράσει αυτό το εμπόδιο και να διευκολύνει την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων με την αποδόμηση των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος, όπως είναι για παράδειγμα τα αλγινικά άλατα που αναφέραμε [337, 338, 345]. Σε μια προηγούμενη μελέτη, ο Barzana et al. παρουσίασε εκχύλιση καρροτενοειδών με ΕΑΕ από την *Tagetes erecta* [236]. Υπο ιδανικές συνθήκες εκχύλισης επιτεύχθηκε απόδοση ανάκτησης καρροτενοειδών έως και 97%. Διάφορες πρωτεάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση βιοδραστικών πεπτιδίων μέσω υδρολυτικών αντιδράσεων [237].

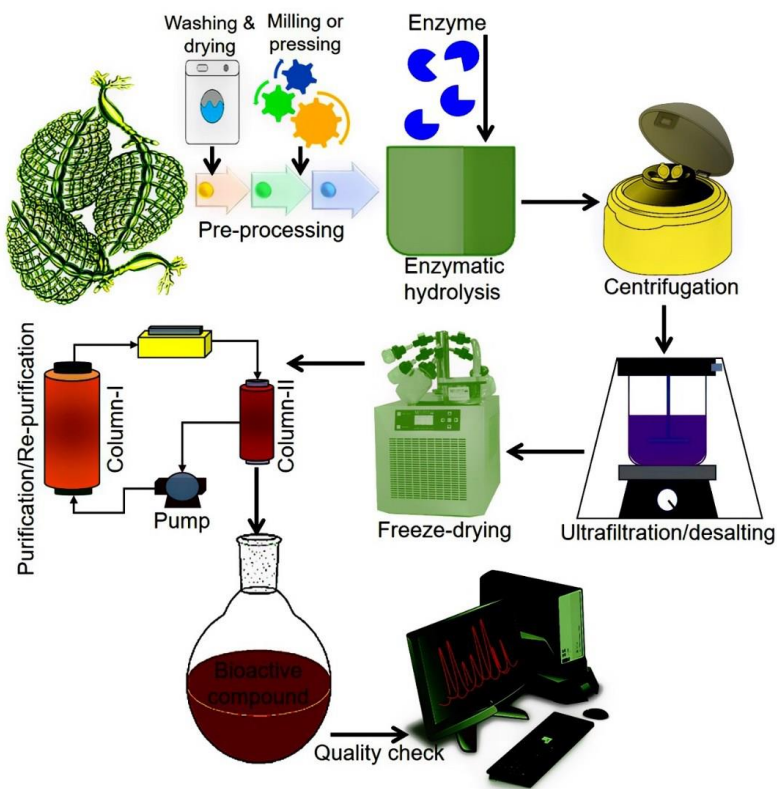
Θα μπορούσαμε να αναφέρουμε και πρόσφατα παραδείγματα όπως του del Pilar Sánchez-Camargo et al. που χρησιμοποιείται ΕΑΕ σε συνδυασμό με PLE για τη βελτίωση της εκχύλισης φλοροτανινών από τα φύκη *Sargassum muticum*. Η ενζυματική επεξεργασία με πρωτεάσες και καρβοϋδράσες, ο συνδυασμός δηλαδή της αλκαλικής υδρόλυσης και PLE με αιθανόλη:νερό ως διαλύτη εκχύλισης έχει μελετηθεί

με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Υπό αυτές τις συνθήκες, έχουν επιτευχθεί για τις συνολικές φαινόλες, τις συνολικές φλοροτανίνες και το TEAC αποδόσεις 21,9%, 94,0 mg ισοδύναμα γαλικικού οξέος g⁻¹, 5,018 mg φλορογλυκανόλη ισοδύναμα g⁻¹ και 1,275 mmol Trolox ισοδύναμα g⁻¹, αντίστοιχα [238].

Σχηματικό Διάγραμμα Ροής της EAE

Από την άποψη της Πράσινης Χημείας και Μηχανικής (Green Chemistry and Engineering, GCE), τα ένζυμα θεωρούνται ιδανικοί βιοκαταλύτες με αξιοσημείωτη δυναμική για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης διευκολύνοντας την αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών που αποτελεί κρίσιμο βήμα στη διαδικασία εκχύλισης. Αυτό, με τη σειρά του, αυξάνει τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος και, ως εκ τούτου, επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων [239]. Πιο συγκεκριμένα, η EAE βασίζεται σε δύο προσεγγίσεις: (1) υδατική ενζυματική εκχύλιση (Enzyme Assisted Aqueous Extraction, EAAE) και (2) υποβοηθούμενη από ένζυμα ψυχρή εκχύλιση (Enzyme Assisted Cold Processing, EACP) [240].

Για αποτελεσματική και υψηλής απόδοσης εκχύλιση, διάφοροι παράγοντες όπως ο τύπος ενζύμων και η συγκέντρωση, το pH και η θερμοκρασία λειτουργίας, το μέγεθος επιφάνειας επαφής, ο λόγος στερεών προς νερό, η περιεκτικότητα σε υγρασία, η σύσταση των υλικών, το μέγεθος των σωματιδίων των δειγμάτων, η επώαση και η υδρόλυση θεωρούνται βασικοί και καθοριστικοί [187, 241, 242]. Σύμφωνα με την GCE, η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με ενζυματικά υποβοηθούμενη μέθοδο τεκμηριώνεται ως μια προσέγγιση φιλική προς το περιβάλλον επειδή χρησιμοποιεί το νερό ως διαλύτη αντί για οργανικές χημικές ουσίες [239, 349]. Το παρακάτω σχήμα 6 απεικονίζει μια σχηματική αναπαράσταση της EAE.



Σχήμα 6. Απλοποιημένο Διάγραμμα Ροής της Ενζυματικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από μικροάλγη

4.3.5 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)

Η Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (UAE) αποτελεί άλλη μια πράσινη διαδικασία εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από πολλές και ποικίλες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων που έχει αποκτήσει σημαντικότητα προσφάτως.

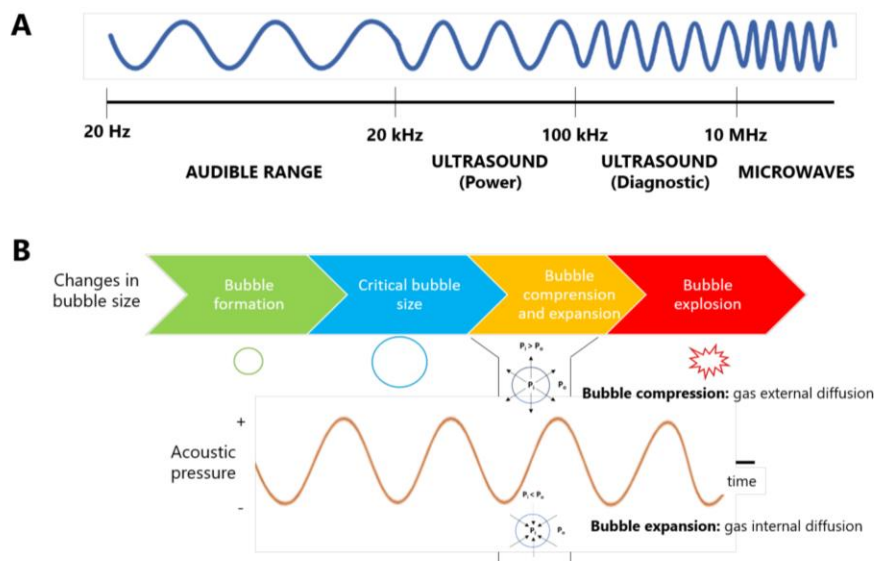
Αυτή η τεχνική βασίζεται στην εφαρμογή υπερηχητικών κυμάτων σε μήτρα βυθισμένη σε υγρό μέσο, προκαλώντας τη ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και απελευθερώνοντας τις ενώσεις-στόχους [243, 331, 332]. Η UAE είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την εκχύλιση πολλών βιοδραστικών συστατικών, διότι παρέχει υψηλές αποδόσεις εκχύλισης χωρίς να παρεμβαίνει στην ακεραιότητά τους, καθώς η θερμοκρασία (T) ελέγχεται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, και επιπλέον, η UAE

ως πράσινη τεχνική, απαιτεί χαμηλούς όγκους διαλυτών για την εκχύλιση ενώ είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας [244, 323].

Επίσης, παρουσιάζει υψηλή ευελιξία, καθώς είναι σε θέση να συνδυαστεί με άλλες μεθόδους εκχύλισης συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων, της διαβροχής, της θερμικής και της υποβοηθούμενης από μικροκύματα εκχύλισης [245, 246, 247, 248, 333]. Σημαντικός είναι βεβαίως και ο ρόλος των διαφόρων μεταβλητών στη διαδικασία εκχύλισης, όπως ο χρόνος εκχύλισης (ET), η θερμοκρασία T, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η αναλογία διαλύτη προς στερεό και η ένταση του υπερήχου (UI) [324].

Επιπλέον των παραπάνω χαρακτηριστικών η εκχύλιση με υπερήχους (UAE) μπορεί να θεωρηθεί μια «καθαρή τεχνολογία» λόγω των εξαιρετικών πλεονεκτημάτων της σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης χαμηλών όγκου διαλυτών, των σύντομων ETs (χρόνος εκχύλισης), τις ελάχιστες απαιτήσεις εξοπλισμού και τις χαμηλές οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις [249, 250, 251, 334].

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί υπερηχητικά κύματα, τα οποία έχουν συχνότητες μεταξύ 20 kHz και 10 MHz, που βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ ηχητικών κυμάτων και μικροκυμάτων (σχήμα 7). Μέσα στο φάσμα υπερήχων, μπορούν να βρεθούν δύο περιοχές, που ονομάζονται: i) υπέρηχοι ισχύος (20-100 kHz), χαρακτηρίζονται από υψηλή ένταση, χρησιμοποιούνται για εφαρμογές εκχύλισης και επεξεργασίας· και ii) υπέρηχοι σήματος ή διαγνωστικοί υπέρηχοι (100 kHz–10 MHz), που χρησιμοποιείται ως κλινική διαγνωστική τεχνική, καθώς και για τον έλεγχο και την αξιολόγηση της ποιότητας όπως για παράδειγμα τη μέτρηση πάχους μετάλλων [252].



Σχήμα 7. (A) Το ηχητικό φάσμα: ηχητικό φάσμα (20 Hz–20 kHz), φάσμα υπερήχων (20 kHz–10 MHz) και φάσμα μικροκυμάτων (>10 MHz). (B) Κύκλος ανάπτυξης φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της ακουστικής σπηλαιώσης. Αποσυμπίεση και συμπίεση. Ένας κύκλος υπερήχων διατηρεί τη φάση διαστολής συμπίεσης. Στη φάση αποσυμπίεσης, το αέριο διαχέεται σε φυσαλίδα επειδή η εξωτερική πίεση (P_o) είναι υψηλότερη από την εσωτερική πίεση (P_i). Ωστόσο, το αέριο διαχέεται εκτός της φυσαλίδας κατά τη διάρκεια της φάσης συμπίεσης λόγω εσωτερικής πίεσης είναι υψηλότερη από την εξωτερική πίεση

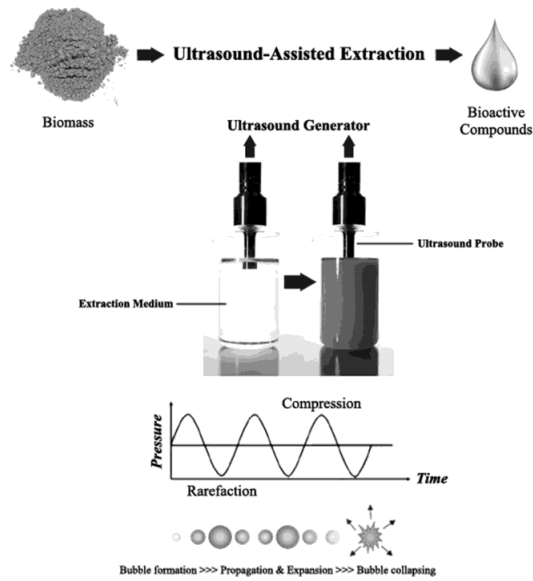
Η εφαρμογή υπερήχων για εκχυλίσεις βασίζεται στη φυσικοχημική αρχή της ακουστικής σπηλαιώσης (Acoustic Cavitation, AC) (4-124). Η AC είναι φυσικοχημικό φαινόμενο που συνίσταται στο σχηματισμό, την ανάπτυξη και την αποδόμηση φυσαλίδων που προκαλείται σε ένα υγρό μέσο από υπερηχητικά κύματα. Η διάδοση των υπερηχητικών κυμάτων μέσω οποιουδήποτε υγρού μέσου περιλαμβάνει το σχηματισμό διαδοχικών διαλειπουσών περιοχών υψηλών και χαμηλών πιέσεων άμεσα ανάλογες με την ισχύ που εφαρμόζεται στο σύστημα, που δημιουργεί φυσαλίδες αερίου σε αυτό το μέσο [253, 254, 255]. Μετά το σχηματισμό, οι φυσαλίδες που αναπτύσσονται ως συνέπεια της αλλαγής πίεσης, που οδηγεί στη συμπίεση και τη διαστολή, φτάνουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος πριν από την κατάρρευσή τους (Σχήμα 7_B), στο οποίο δημιουργείται ένα θερμό σημείο (hot spot), έχοντας ως αποτέλεσμα αύξηση της θερμοκρασίας T_s έως 5000 K και της πίεσης περίπου 50-1000 atm [254, 255]. Με αυτή την έννοια, η AC αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τις επιπτώσεις εκχύλισης της κατεργασίας με υπερήχους, παράγοντας δύο τύπους επίδρασης, δηλαδή φυσικής και χημικής, ανάλογα με τις περιοχές συχνοτήτων που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Φυσικοχημικές επιδράσεις των UAE

Υπάρχουν διάφορα φυσικά φαινόμενα που αποδίδονται στην Ακουστική Σπηλαίωση (AC), σχετικά με την εφαρμογή υπερήχων με σκοπό την εκχύλιση, με βάση τη χαμηλή συμπίεστικότητα των υγρών. Σε αυτό τον τρόπο, ο σχηματισμός φυσαλίδων εμφανίζεται όταν τα υπερηχητικά κύματα προκαλούν τις απότομες αλλαγές πίεσης στο υγρό μέσο, το οποίο αντιδρά απελευθερώνοντας την παραγόμενη πίεση εφελκυσμού και, μετά, προκαλώντας μικροφυσαλίδες. Υπάρχουν δύο μηχανισμοί σχηματισμού φυσαλίδων: (i) οι προϋπάρχουσες φυσαλίδες στο υδατικό μέσο που είναι σταθερές κατά τη διάλυση ή (ii) η παρουσία αερίου που παγιδεύεται στα στερεά σωματίδια και των μικρο-ρωγμών που παρατηρούνται στα τοιχώματα [256]. Ανεξάρτητα όμως από το μηχανισμό, σχηματίζονται μικροφυσαλίδες κατά την εισαγωγή κυμάτων υπερήχων στο υδατικό μέσο. Ως εκ τούτου, η χαμηλότερη ακουστική πίεση στην οποία παρατηρείται είναι γνωστή ως οριακή πίεση Blake (P_B) [257].

Μόλις σχηματιστούν φυσαλίδες, η ανάπτυξή τους εξαρτάται από τη συχνότητα, την πίεση υπερήχων και τη διάμετρο των φυσαλίδων. Η ανάπτυξη φυσαλίδων μπορεί να συμβεί μέσω δύο πιθανών μηχανισμών, δηλαδή [258]: i) της συνένωσης, με την οποία δύο μικρές οι φυσαλίδες συνδυάζονται και συνενώνονται για να σχηματίσουν μια μεγαλύτερη; και ii) διορθωμένη διάχυση, στην οποία η φυσαλίδα αναπτύσσεται με την πάροδο του χρόνου λόγω μιας κλιμάκωσης πίεσης που αυξάνεται από τις εξωτερικές προς τις εσωτερικές περιοχές των φυσαλίδων, ωθώντας την εισαγωγή αερίου μετά από διαδοχικούς κύκλους συμπίεσης και αποσυμπίεσης [259, 260]. Τέλος, οι φυσαλίδες καταρρέουν στο τέλος της ακουστικής σπηλαίωσης (Σχήμα 7_B), όταν οι χαμηλές συχνότητες (<1 MHz) υπερβαίνουν την τιμή P_B και, κατά συνέπεια, οι φυσαλίδες μπορούν να φθάσουν στο κρίσιμο (μέγεθος αντηχίας), με τη δημιουργία επιδράσεων συμπίεσης και αποσυμπίεσης [254, 255].

Σε αυτό το επίπεδο, η κατάρρευση των φυσαλίδων συμβαίνει μετά από αρκετούς ακουστικούς κύκλους, που κατατάσσονται στην σταθερή σπηλαίωση (μη αδρανειακή) [261]. Εντούτοις, σε υψηλότερες ακουστικές πιέσεις, το μεταβατικό κατώτατο όριο στην οποία η φυσαλίδα γίνεται ασταθής και καταρρέει, επιτυγχάνεται μετά από έναν ή λίγους κύκλους. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως παροδική σπηλαίωση (αδρανειακή) και συχνά συνοδεύεται από κατακερματισμό σε μικρότερες φυσαλίδες ή απαέρωση, η οποία εμποδίζει τη σπηλαίωση [262, 255].



Σχήμα 8. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

Η ενέργεια σε μια δέσμη υπερήχων ορίζεται ως η συνολική ενέργεια που διαπερνά την κάθετη τομή της δέσμης στη μονάδα του χρόνου (ρυθμός μετάδοσης). Αν η ένταση είναι ενιαία τότε

$$\text{Ισχύς} = \text{ένταση (W/cm}^2\text{)} \times \text{επιφάνεια (cm}^2\text{)}$$

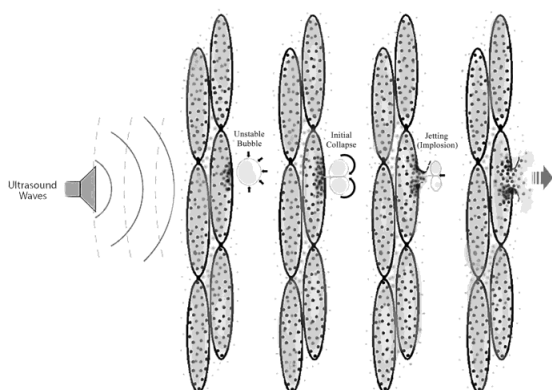
Όταν η ένταση δεν είναι ομοιογενής, τότε οι τμηματικές μεταβολές μέσα στη δέσμη λαμβάνονται υπόψη. Η βιομηχανική εφαρμογή των υπερήχων μπορεί να ταξινομηθεί ως εξής: χαμηλής έντασης υπέρηχοι (LIU) με λιγότερο από 1 W/cm² (υψηλή συχνότητα 100kHz – 1MHz και χαμηλή ισχύ, τυπικά λιγότερο από 1 W/cm²) και υψηλής έντασης υπέρηχοι (HIU) με 10-1000 W/cm². Η HIU εφαρμόζεται σε χαμηλές συχνότητες (16-100 kHz) αλλά σε υψηλή ισχύ (τυπικά 10-1000 W/cm²) ώστε να επιδράσει και τροποποιήσει διεργασίες και προϊόντα με τη φυσική διάσπαση των ιστών η οποία εφαρμόζεται κυρίως για τις διαδικασίες εκχύλισης [263].

Σύμφωνα με την εξίσωση (1), η ακτίνα (R) της φυσαλίδας είναι αντίστροφα ανάλογη της συχνότητας [256, 257]. Με άλλα λόγια, όσο χαμηλότερη είναι η συχνότητα, τόσο υψηλότερο είναι το κρίσιμο μέγεθος της φυσαλίδας. Ως εκ τούτου, σε χαμηλές συχνότητες, δηλαδή 20 kHz, οι φυσαλίδες επιτυγχάνουν μεγαλύτερα μεγέθη και η επακόλουθη κατάρρευση έχει ως αποτέλεσμα τα ισχυρά κρουστικά κύματα, ενώ συχνότητες άνω του 1 MHz οδηγούν σε σύντομους κύκλους συμπίεσης–αποσυμπίεσης

και η κατάρρευση της φυσαλίδας οδηγεί σε αδύναμα κρουστικά κύματα, με τελική επικράτηση των χημικών επιδράσεων [258].

$$R \times F \approx 3$$

Οι χημικές επιδράσεις των UAE κυριαρχούν σε υψηλές συχνότητες μεταξύ 100 kHz και 1 MHz [255]. Μετά την κατάρρευση της φυσαλίδας, δημιουργείται μια τοπική θερμή περιοχή, που φτάνει σε εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία ($T > 5000\text{K}$), συμβάλλοντας στο σχηματισμό ριζών ^+H και ^-OH σε κορεσμένο αέρα διαλυτών, οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως πρωτογενείς ρίζες που αντιδρούν με άλλα μόρια [264]. Κατά συνέπεια, ο αριθμός των ριζών που παράγονται εξαρτάται από το μέγεθος της σπηλαίωσης της φυσαλίδας καθώς και από τη θερμοκρασία του θερμού σημείου. Ωστόσο, ο σχηματισμός ριζών εξαρτάται επίσης από τον αριθμό ενεργών φυσαλίδων και, για τον λόγο αυτό, διαμορφώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε ενδιάμεσες συχνότητες [264].



Σχήμα 9. Η Επίδραση των Υπερήχων σε Κυτταρικό Επίπεδο

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη εκχύλιση με την υποβοήθηση υπερήχων συνοψίζονται στους παρακάτω έξι [265]:

- Κατακερματισμός και διάσπαση των σωματιδίων (fragmentation) που προκαλείται από τη σύγκρουση μεταξύ των σωματιδίων
- Διάβρωση (erosion) που προκαλείται από την διάσπαση των φυσαλίδων
- Υπερηχητική τριχοειδής διείσδυση (sonocapillary) που επιτυγχάνεται με την ενίσχυση διείσδυσης του διαλύτη σε πόρους του υλικού
- Αποδόμηση (detexturation) του υλικού λόγω της επίδρασης των υπερήχων

- Αύξηση του πορώδους (sonoporation) των επιφανειών του υλικού εκχύλισης
- Τοπική επιφανειακή τάση (local shear stress) μεταξύ του υλικού εκχύλισης και του διαλύτη που τελικά οδηγεί σε διάσπαση της μεμβράνης και εκχύλισης των συστατικών στη μάζα του διαλύτη

Επίδραση του διαλύτη UAE

Ο διαλύτης αποτελεί μια σημαντική παράμετρος καθώς είναι εκείνο το μέσο που από το οποίο περνούν τα υπερηχητικά κύματα που μεταδίδεται από την πηγή εκπομπής στον εκχυλιζόμενο στοιχείο. Έτσι, η φύση του διαλύτη και οι ιδιότητες εκχύλισης, η θερμοκρασία εκχύλισης T , και η παρουσία αερίων αποτελούν υψίστης σημασίας παράγοντες που συνδέονται με την UAE.

Ο διαλύτης είναι ένας βασικός παράγοντας που σχετίζεται με τις περισσότερες τεχνικές εκχύλισης, καθώς διαλύεται το περιεχόμενο που απελευθερώνεται από τα κύτταρα στόχο. Η πολικότητα των διαλυτών είναι σημαντική για την επίτευξη διαλυτότητας των συστατικών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Έτσι, ο διαλύτης που επιλέγεται εξαρτάται από την ουσία στόχο. Για παράδειγμα, κατά την εκχύλιση πολικών ενώσεων όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνη, το νερό είναι ο πιο κοινός διαλύτης [220]. Όσον αφορά την εξαγωγή μη πολικών ενώσεων όπως τα λιπίδια, αυτό συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση διαλυτών που δεν ακολουθούν τις αρχές της Πράσινης Χημείας, όπως το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο. Για να το λύσουμε αυτό πρόβλημα, νέοι πράσινοι διαλύτες αξιολογούνται για εκχύλιση λιπιδίων, όπως τα ιοντικά υγρά και ισχυρά ευτηκτικοί διαλύτες παρέχοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα αλλά και φυσικά αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών που αναλύσαμε πειραματικά [265, 266].

Άλλες σημαντικές παράμετροι διαλύτη είναι το ιξώδες, η επιφανειακή τάση και τάση ατμών, που θα πρέπει να αξιολογούνται εξίσου καθώς μπορούν να επηρεάσουν τη σπηλαίωση [267]. Με αυτή την έννοια, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση επηρεάζουν το όριο σπηλαίωσης δεδομένου ότι οι διαλύτες με το υψηλό ιξώδες ή την ένταση επιφάνειας θα χρειαστούν υψηλότερες τιμές της υπερηχητικής ακτινοβολίας για την επίτευξη του ορίου σπηλαίωσης [252]. Ομοίως, η πίεση ατμού διαλύτη είναι κρίσιμος παράγοντας για την UAE, δεδομένου ότι οι χαμηλότερες τιμές επιτρέπουν την αύξηση της ισχύος διάσπασης της φυσαλίδας, που μπορεί έτσι να διαχυθεί ευκολότερα στο μέσο [267, 268].

Τέλος, η θερμοκρασία του διαλύτη και εν γένει της εκχύλισης είναι μια σημαντική παράμετρος καθώς επηρεάζει τόσο τα φυσικά χαρακτηριστικά του διαλύτη όσο και τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τη δυνατότητα διάχυσης των συστατικών στο μέσο.

Επίδραση του εκχυλιζόμενου συστήματος με UAE

Διάφορες παράμετροι που σχετίζονται με το εκχυλιζόμενο υλικό επηρεάζουν την εκχύλιση συστατικών ενδιαφέροντος, όπως ο τύπος του υλικού, η δομή, η προεπεξεργασία, το μέγεθος των σωματιδίων ή η αναλογία στερεού-υγρού, στοιχεία που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών εκχύλισης [269]. Η UAE έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως αναφέρθηκε σε πολλές ουσίες, όπως φυτά (βότανα, σπόροι, ιστοί κ.λπ.), θαλάσσιες πηγές (φύκη, μικροφύκη κ.λπ.) και μικροβιακές πηγές (ζυμομύκητες και βακτήρια) για εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων [273]. Το εκχυλιζόμενο στοιχείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε υγρό είτε ξηρό. Ωστόσο, κατά την εκχύλιση φυκών και μικροφυκών, ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης με τη χρήση ξηρών δειγμάτων, καθώς βελτιώνεται η περατότητα και η μεταφορά μάζας [272, 270, 271]. Ομοίως, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων βελτιώνει επίσης την απόδοση εκχύλισης, και έτσι σε αρκετές μελέτες βλέπουμε να έχουν αλέσει τα δείγματα ώστε να μην υπάρχουν μεγάλα σωματίδια [274]. Άλλες προεπεξεργασίες μπορούν επίσης να εφαρμοστούν, ανάλογα με τις στοχευμένες ενώσεις, όπως οι χημικές διάσπαση, μηχανική διάσπαση, ενζυματική επεξεργασία, απολίπωση ή εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Pulse Electric Fields) [272].

Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι Ποιοτικού και Ποσοτικού Προσδιορισμού των Βιοδραστικών Ουσιών από Μικροφύκη

5.1 Επισκόπηση των μεθόδων προσδιορισμού βιοδραστικών ουσιών από μικροφύκη

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε στις βασικές μεθόδους ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των βιοδραστικών ουσιών που παράγονται από τα μικροφύκη. Οι βασικές αναλυτικές που χρησιμοποιούνται είναι η Φασματομετρία UV-Vis, η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), Υψηλής Απόδοσης Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (High Performance-Thin Layer Chromatography, HP-TLC), η Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC), η Υγρή Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, LC-MS), με Ιοντισμό Εκρόφησης με Λείζερ Υποβοηθούμενο από τη Μήτρα (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), ES καθώς και οι κλασικές αναλυτικές μέθοδοι για τον ποιοτικό διαχωρισμό των βιοδραστικών ουσιών [363, 364, 365].

Φασματομετρία UV-VIS

Η Φασματομετρία UV-VIS χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των χρωστικών που παράγονται από μικροφύκη. Ωστόσο, ο ποσοτικός προσδιορισμός των χρωστικών όπως της χλωροφύλλης α, β και των καροτενοειδών σε ολόκληρο εκχύλισμα χρωστικών ουσιών με φασματοσκοπία UV-VIS εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του δείγματος, το σύστημα διαλύτη και τις παραμέτρους φασματοφωτόμετρου. Για παράδειγμα, η αύξηση της πολικότητας του διαλύτη, το ανώτατο όριο απορρόφησης της χλωροφύλλης από την κόκκινη απορρόφηση μετατοπίζεται από 660 σε 665 nm και η μέγιστη μπλε απορρόφηση από 428 σε 432 nm. Το ίδιο ισχύει και για τη χλωροφύλλη β, η οποία μετατοπίζεται από 642 σε 652 nm και 452 σε 469 nm αντίστοιχα [70, 351].

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν φασματοσκοπικές μετρήσεις στις σωστές μέγιστες περιοχές, θα πρέπει να προσδιορίζεται η μέγιστη κόκκινη φασματική θέση των

καθαρών διαλυμάτων χλωροφύλλης α και β με το κάθε φασματοφωτόμετρο και να συγκρίνονται με εκείνες της βιβλιογραφίας. Το φάσμα απορρόφησης ενός εκχυλίσματος πράσινου ιστού περιέχει γενικά μείγματα χλωροφύλλης α και β και ολικών καροτενοειδών, στα οποία κυριαρχεί η απορρόφηση της χλωροφύλλης α στα A₄₂₈ (μπλε) και A₆₆₁ (κόκκινο). Η χλωροφύλλη β και τα καροτενοειδή απορροφούν την ακτινοβολία ευρέως στην μπλε περιοχή (400 έως 500 nm) [352].

Είναι συνηθισμένο ο ποσοτικός προσδιορισμός των υδατανθράκων μικροφυκών να γίνεται με το πρωτόκολλο φαινόλης-θειικού οξέος, όπου τα σάκχαρα υδρολύονται σε φουράνια και μετρίεται φασματοφωτομετρικά στα 490 nm για εξόζες και 480 nm για πεντόζες και ουρωνικά οξέα [353]. Για αμινοοξέα οι τιμές απορρόφησης ποσοτικού προσδιορισμού ποικίλουν από 330 έως 310 nm [354].

Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και ***Υψηλής Απόδοσης – Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας*** (High Performance – Thin Layer Chromatography, HP-TLC).

Η TLC είναι η παλαιότερη και ευρέως διαδεδομένη αναλυτική χρωματογραφική τεχνική για τον έλεγχο των εκχυλισμάτων φυτών και μικροφυκών. Η διαδικασία διαχωρισμού περιλαμβάνει κατάλληλο προσροφητικό υλικό (στατική φάση) και μείγμα διαλύτη ή διαλύτη (κινητή φάση). Με την μέθοδο TLC, ένα ευρύ φάσμα ουσιών που διαλύονται σε όλους τους διαλύτες ακόμη και στους πλέον επιθετικούς και διαβρωτικούς μπορούν να αναλυθούν [355]. Πρόσφατα, για τον έλεγχο των χρωστικών ουσιών από μικροφύκη χρησιμοποιείται συχνά και η HP-TLS ως πιο αποτελεσματική και ακριβής μέθοδος.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η αναδυόμενη τεχνική που χρησιμοποιείται σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο κατά τις τελευταίες δεκαετίες, σε συνδυασμό με την ανίχνευση συστοιχίας UV ή φωτοδιόδου (PDA). Είναι μία από τις καταλληλότερες τεχνικές για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των ακατέργαστων εκχυλισμάτων ή κλασμάτων αυτών. Οι στήλες αντίστροφης φάσης είναι η καλύτερη

επιλογή για το αναλυτικό διαχωρισμό, ακόμη και αν έχουν αξιοποιηθεί νέες στατικές φάσεις [356].

Η χρωματογραφία προσφέρει έναν αποτελεσματικό τρόπο προσδιορισμού των υδατανθράκων, λιπαρών οξέων, αμινοξέων, καροτενοειδών και άλλων λειτουργικών ενώσεων από μικροφύκη [353, 357, 358].

Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, LC-MS)

Η Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS) συνδυάζει την υψηλή ισχύ διαχωρισμού της Υψηλής Απόδοσης Χρωματογραφίας (HPLC) με τις δομικές πληροφορίες της φασματομετρίας μάζας. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση των μεθόδων LC-MS βελτιώνονται δραστικά σχετικά με την παραδοσιακή ανίχνευση UV/PDA και επιτρέπει τη χρήση πολύ γρήγορων χρωματογραφικών διαχωρισμών με υψηλή αιχμή της τιμής καθαρότητας.

Μια βασική εξέλιξη αυτής της τεχνικής είναι η χρήση του Ιονισμού Ψεκασμού Ηλεκτρονίων (Electron Spray Ionization, ESI) ή ο Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) που μόρια της αναλυθείσας ουσίας μεταφέρονται από το διάλυμα σε αέρια φάση, κατάλληλα για κλασμάτωση σε φασματομέτρο μάζας [356]. Το LC-ESI/APCI-MS έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των εστέρων καροτενοειδών που υπάρχουν σε εκχυλίσματα χρωστικών μικροφυκών γλυκού νερού αλλά και για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση γλυκολιπιδίων από μικροφύκη [359].

Φασματομετρία χρόνου πτήσης με Ιοντισμό Εκρόφησης με Λείζερ Υποβοηθούμενο από τη Μήτρα (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)

Η MALDI-TOF MS είναι υψηλής απόδοσης τεχνική για να αναλύει και διακρίνει το αποτύπωμα πρωτεϊνών και να χαρακτηρίζει τον φαινότυπο (γένος, είδη) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα στελέχη των μικροφυκών, συγκρίνοντας τα φάσματα των άγνωστων μικροοργανισμών με τα φάσματα αναφοράς που βρίσκονται σε διεθνείς βάσεις δεδομένων [360]. Η δυνατότητα χρήσης της MALDI-TOF-MS για τον ταχύ εντοπισμό παθογόνων και μη παθογόνων ειδών του γένους *Prototheca* έχει αποδειχθεί

πρόσφατα και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα των δυνατοτήτων της μεθόδου [361].

Ιονισμός Ηλεκτρονίων (EI) και χημικός ιονισμός (CI) (Electron Ionization (EI) and Chemical Ionization (CI))

Η ανίχνευση με ιονισμό ηλεκτρονίων (EI) βασίζεται σε ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας που αλληλεπιδρούν με άτομα ή μόρια αέριας φάσης για την παραγωγή ιόντων. Η EI-MS έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της στερόλης, χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι απαιτείται πρότερη εστεροποίηση για ανάλυση λιπαρών οξέων με χρήση EIMS. Ο EI-MS έχει ασθενές μοριακό σήμα ιόντων λόγω της σύγκρουσης υψηλής ενέργειας. Έτσι, αναπτύχθηκε ο Χημικός Ιονισμός (CI) για να παράγουν ένα ακέραιο μοριακό είδος ιόντων χρησιμοποιώντας χαμηλότερη ενέργειας σύγκρουση της αναλυτέας ουσίας και των ιόντων ενός αερίου αντιδραστήριου. Το ακέραιο σήμα του μοριακού ιόντος για λιπαρά οξέα, ανιχνεύεται επιτυχώς με τη χρήση πενταφθοροβενζυλο-βρωμίου και αρνητικού χημικού ιονισμού (NCI). Ωστόσο, η EI/CI MSbased ως μέθοδος ανάλυσης λιπιδίων είναι περιορισμένη λόγω των δυσάρεστα παράγωγων βημάτων και της χαμηλότερης ευαισθησίας [368].

Προσδιορισμός Υγρασίας και Τέφρας με τη μέθοδο Round Robin (Description of the Round Robin Procedures: Moisture and Ash Determination)

Μια νέα αλλά καθιερωμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της βιομάζας φυκών σε υγρασία και τέφρα σύμφωνα με τις δημοσιευμένες Εργαστηριακές Αναλυτικές Διαδικασίες NREL [362]. Η βιομάζα φυκών (100 mg) ζυγίστηκε σε κεραμικά χωνευτήρια και ξηραίνονται όλη τη νύχτα σε κλίβανο ξήρανσης (105 °C). Την επόμενη μέρα, τα χωνευτήρια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντικό θάλαμο και ζυγίζονται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία. Ο προσδιορισμός της τέφρας πραγματοποιείται με μία από τις δύο μεθόδους (και οι δύο που περιγράφονται στο LAP): προαποτέφρωση του υλικού αποξηραμένων φυκών σε φούρνο πάνω από καυστήρα Bunsen ακολουθούμενο από τοποθέτηση σε κλίβανο (575 °C) μέχρι σταθερού βάρους ή τοποθέτηση σε κλίβανο με κλιμακωτό θερμοκρασιακό πρόγραμμα μέχρι το σταθερό βάρος.

Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Soxhlet (Soxhlet Extraction)

Η εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet εφαρμόζεται με 100ml διαλύτη σε 5g ξηρής μάζας μικροάλγους σε συσκευή Soxhlet. Το εκχύλισμα φιλτράρεται για να απομακρυνθούν πιθανά στερεά σωματίδια. Οι οργανικοί διαλύτες συμπυκνώνονται με εργαστηριακό περιστροφικό εξατμιστή και τα ίχνη υπολειμμάτων διαλύτη απομακρύνονται με διάχυση αζώτου. Η απόδοση υπολογίζεται στη μάζα του εκχυλιζόμενου ελαίου αλλά και της αρχικής ξηρής μάζας. Η ίδια εκχύλιση επαναλαμβάνεται τουλάχιστο 3 φορές για κάθε εφαρμοζόμενο διαλύτη.

ΜΕΡΟΣ Β: Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 6. Ανάκτηση (εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων και υπερήχων, υπερκρίσιμη εκχύλιση με χρήση CO₂), χαρακτηρισμός-εξευγενισμός των ξανθινών και των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από επιλεγμένα μικροφύκη

Εισαγωγή

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, εκχυλίσματα ασταξανθίνης και άλλων καροτενοειδών ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το φύκος *Haematococcus pluvialis* καθώς επίσης και εκχυλίσματα εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA), εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (DHA) και ωμέγα-3- λιπαρών οξέων ανακτήθηκαν από ξηρή βιομάζα προερχόμενη από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των διεργασιών εκχύλισης και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων τους με σκοπό τη μέγιστη ανάκτηση των παραπάνω ουσιών από μικροάλγη [346]. Η μεθοδολογία ξήρανσης της βιομάζας είναι επίσης σημαντική και επιδρά στην ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών [382].

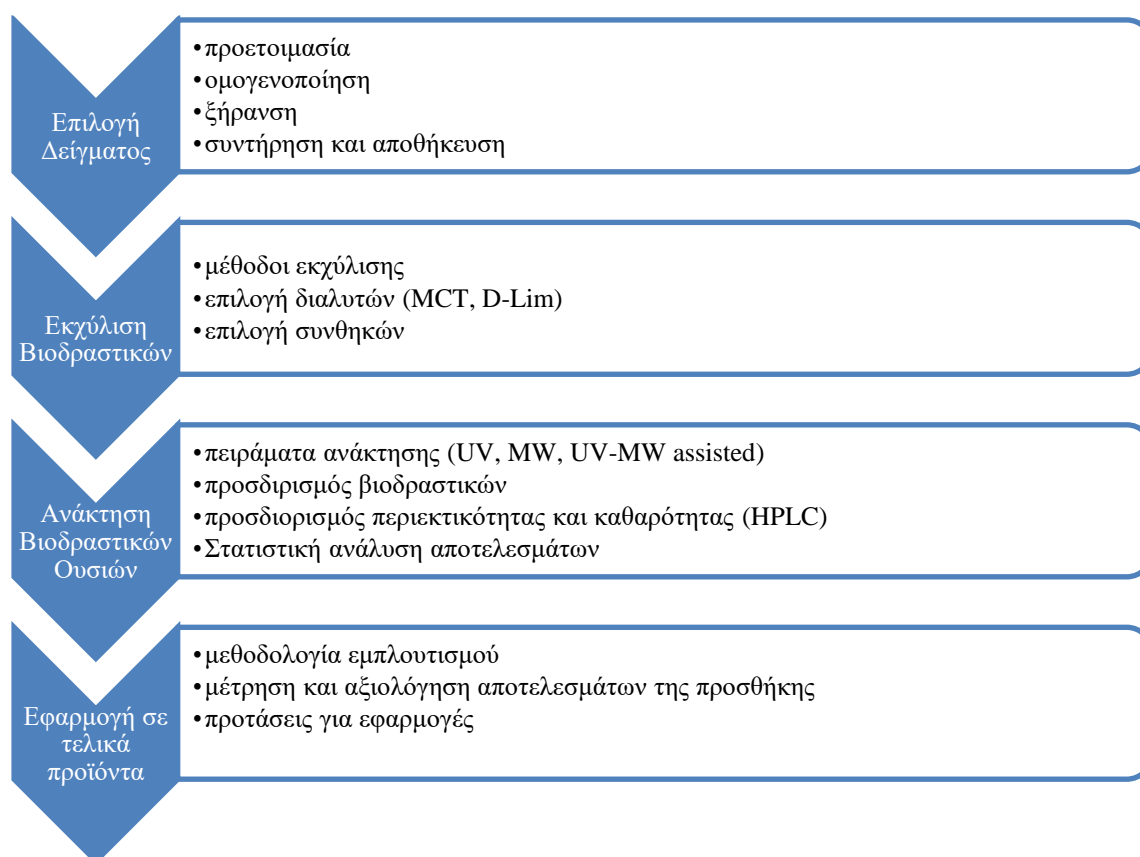
Η εκχύλιση των βιοδραστικών που αναφέρθηκαν παραπάνω έγινε με χρήση φυσικών διαλυτών όπως είναι το φυσικό έλαιο μεσαίας αλυσίδας τριγλυκεριδίων (Medium Chain Triglycerides, MCT) καθώς επίσης και το D-Limonene όπως αυτό προκύπτει και ανακτάτε κατά την επεξεργασία των εσπεριδοειδών [381, 404, 375].

Στη συνέχεια, εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη βέλτιστη διεργασία εκχύλισης ενσωματώθηκαν σε προϊόντα χυμών. Σε άλλη εφαρμογή πρωτεΐνες και λιπαρά σε αρτοσκεύασμα τύπου *brioche* αντικαταστάθηκαν από εκχυλίσματα από το μικροφύκος της *Chlorella vulgaris*. Η προσθήκη εκχυλισμάτων πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από το φύκος *Haematococcus pluvialis* και το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* σε προϊόντα χυμών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φυσικών προϊόντων με αυξημένη διατροφική αξία, βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά αλλά και μακρύτερο χρόνο συντήρησης.

Συγκεκριμένα, η χρήση εκχυλισμάτων από το φύκος *Haematococcus pluvialis* έχει ως αποτέλεσμα τη φυσική ενίσχυση του χρώματος των προϊόντων λόγω της παρουσίας

των καροτενοειδών, καθώς επίσης και την επέκταση της διατηρησιμότητας των προϊόντων λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση του χρόνου ζωής των προϊόντων και την αύξηση της διατροφικής τους αξίας. Ως αποτέλεσμα, η προσθήκη των παραπάνω εκχυλισμάτων προωθεί την αντικατάσταση των ευρέως χρησιμοποιούμενων συνθετικών προσθέτων όπως το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) ή την βουτυλοϋδροξυανισόλη (BHA) τα οποία τα τελευταία χρόνια θεωρούνται ύποπτα για την ανθρώπινη υγεία.

Στο παρακάτω διάγραμμα 1 φαίνονται τα βήματα της μεθοδολογίας της πειραματικής εργασίας



Διάγραμμα 1. Βήματα της μεθοδολογίας της πειραματικής διαδικασίας

6.1 Εκχυλίσματα ασταξανθίνης και καροτενοειδών από το φύκος *Haematococcus pluvialis*

Το πράσινο φύκος *Haematococcus pluvialis* είναι ένα είδος χλωροφύτων γλυκού νερού που ευδοκιμεί σε εύκρατες ζώνες σε όλο τον κόσμο [383, 384]. Σύμφωνα με τη φυσιολογία του, ο *H.pluvialis*, κατά τη διάρκεια δυσμενών συνθηκών ανάπτυξης δηλαδή κάποιου είδους στρες, όπως η έλλειψη θρεπτικών ουσιών και το υπερβολικό φως, ξεκινά συσσώρευση καροτενογένεσης και λιπιδίων, ενώ υποβάλλεται σε μορφολογική μετατροπή από πράσινα φυτικά κύτταρα σε βαθύ κόκκινο σχηματίζοντας μάλιστα βαθιές κόκκινες κύστες που οφείλονται στη συσσώρευση των καροτενοειδών [377, 385, 386]. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, το *H.pluvialis* περιέχει λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και μέταλλα [387]. Οι επιστήμονες προσπαθούν συστηματικά να βελτιστοποιήσουν τις μεθόδους και το σύστημα καλλιέργειάς του προκειμένου να επιτύχουν την υψηλότερη συγκέντρωση ασταξανθίνης μέσα στις κόκκινες κύστες του *H.pluvialis* [388].

Έτσι, το φύκος *Haematococcus pluvialis* αποτελεί πλούσια πηγή καροτενοειδών και ιδιαίτερα ασταξανθίνης (3,30-διυδροξυ-β-β-καροτένιο-440-διόνη), από τα σημαντικότερα καροτενοειδή λόγω των πολλαπλών ωφέλιμων ιδιοτήτων, που αποτελεί περίπου το 80% των συνολικών καροτενοειδών και μπορεί να φτάσει σε συγκεντρώσεις έως 4% της ξηρής μάζας του [389, 390, 405].

Προκειμένου να αξιοποιηθούν οι λειτουργικές ιδιότητες των μικροφυκών, οι βιοδραστικές ενώσεις τους πρέπει να ανακτηθούν με αποτελεσματικές και μη καταστρεπτικές μεθόδους καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες. Η ανάκτηση τους βασίζεται μέχρι σήμερα κυρίως σε συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, όπως αναφέραμε με χαμηλό κόστος επεξεργασίας και ευκολία λειτουργίας αλλά και μειονεκτήματα που αναφέραμε καθώς και την πιθανότητα θερμικής αποικοδόμησης των βιοδραστικών ενώσεων δεν μπορεί να αγνοηθεί, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια των μεγάλων χρόνων εκχύλισης [391]. Έτσι, προσφάτως, δοκιμάζονται νέες, αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον, καθαρές, κλιμακούμενες και χαμηλού κόστους τεχνικές, όπως η εκχύλιση με υπερήχους (HAE) και μικροκύματα αλλά και συνδυασμός αυτών που ήδη αναλύσαμε και που μπορεί να φτάσουν σε υψηλές αποδόσεις μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα [392]. Σε

βιομηχανική κλίμακα, τα ΗΑΕ είναι μια κατάλληλη μέθοδος για την εκχύλιση καροτενοειδών από μικροφύκη τόσο από περιβαλλοντική όσο και από οικονομική [393, 394, 376].

Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί οι συνεχώς αυξανόμενοι νομοθετικοί περιορισμοί οδήγησαν στην αναζήτηση λύσεων χωρίς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκχύλιση πολύτιμων λιπόφιλων ενώσεων από μικροφύκη (European Parliament Council, 2008; The European Parliament And The Council Of The European Union, 2009). Μεταξύ αυτών των εναλλακτικών λύσεων, το D-λιμονένιο από εσπεριδοειδή καθώς και το έλαιο τριγλυκεριδίων μέσης αλυσίδας (MCT) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντικατάσταση οργανικών διαλυτών και δοκιμάζονται στα πειράματά της παρούσας μελέτης [395].

Το D-λιμονένιο είναι ένα φυσικό προϊόν που περιέχει ένα κυκλικό μονοτερπένιο και αποτελεί το πιο σημαντικό συστατικό του ελαίου που εξάγεται από τον φλοιό εσπεριδοειδών με πιθανές χημειοπροστατευτικές και αντικαρκινικές δραστηριότητες [396, 397]. Το έλαιο MCT είναι μια μοναδική μορφή διαιτητικού λίπους με εξαιρετικές ιδιότητες [398]. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα D-λιμονένιου και MCT μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε τρόφιμα, χωρίς την αφαίρεση του διαλύτη [399, 400].

Είναι, ωστόσο, πολύ σημαντικό να αναφερθεί ακόμη, πως τόσο η μεθοδολογία προκατεργασίας όσο και η τεχνική ξήρανσης των μικροφυκών προς επεξεργασία διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο αφενός στα χαρακτηριστικά της ξηρής μάζας και αφετέρου στην ποιότητα και την ποσότητα των ανακτώμενων βιοδραστικών ουσιών και απασχολεί την παρούσα έρευνα [395].

Η ανάκτηση των καροτενοειδών και ειδικότερα της ασταξανθίνης από το φύκος *Haematococcus pluvialis* πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία με τεχνικές εκχύλισης παρουσία Υπερήχων, Μικροκυμάτων και συνδυασμό Υπερήχων και Μικροκυμάτων (EYM), υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα και εκχύλιση με μικρογαλακτώματα, οι οποίες είναι γνωστές για τις υψηλές αποδόσεις, τη διατήρηση των ιδιοτήτων των βιοδραστικών ενώσεων, το σύντομο χρόνο εκχύλισης και τη φιλικότητα προς το περιβάλλον.

Η επιλογή των διαλυτών εκχύλισης βασίστηκε τόσο στη λιπόφιλη φύση των καροτενοειδών και της ασταξανθίνης όσο και στους ολοένα αυστηρότερους νομοθετικούς περιορισμούς και τις καταναλωτικές προτιμήσεις. Έτσι, ως διαλύτες εκχύλισης επιλέχθηκαν τελικά ως αναφέραμε, έλαια όπως το έλαιο πορτοκαλιού το οποίο αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας χυμού και το έλαιο τριγλυκεριδίων μέσης αλυσίδας (MCT). Εξάλλου, ως διαλύτης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη καθώς με βάση τη βιβλιογραφία παρουσιάζει τη βέλτιστη ανάκτηση καροτενοειδών [401].

6.1.1 Εκχύλιση παρουσία Υπερήχων, Μικροκυμάτων και συνδυασμού Υπερήχων και Μικροκυμάτων (EYM)

6.1.1.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Η ξηρή βιομάζα από το φύκος *Haematococcus pluvialis* παραχωρήθηκε από την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις ήταν αναλυτικής ποιότητας ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις ήταν ποιότητας HPLC. Η ακετόνη, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η μεθανόλη, ο βουτυλομεθυλαιθέρας, το νερό, το άλας άνυδρου θειικού νατρίου, το φωσφορικό οξύ αγοράστηκαν από την εταιρεία Fisher scientific, UK. Το ένζυμο χολινεστεράσης και τα πρότυπα ασταξανθίνης και trans-beta-apo-8'-carotenal αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (USA). Το MCT και το έλαιο πορτοκαλιού παραλήφθηκαν από την εταιρεία ΑΣΠΙΣ Α.Ε.

Μέθοδοι

Πειράματα εκχύλισης

Το φύκος *Haematococcus pluvialis* και το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* εκχυλίστηκαν σε συσκευή εκχύλισης XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) όπως φαίνεται στην Εικόνα 10 χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης:

- παρουσία υπερήχων,
- παρουσία μικροκυμάτων και
- παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων,

σε διάφορες συνθήκες όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 16 για το φύκος *Haematococcus pluvialis*. Οι εκχυλίσεις με μικροκύματα και υπερήχους καθώς και οι αναλύσεις των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ανάλυσης και Σχεδιασμού Διεργασιών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π., Αθήνα, Ελλάδα.



Εικόνα 13. Εκχύλιση φύκους *Haematococcus pluvialis* παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων

Πίνακας 16. Μέθοδοι και Συνθήκες Εκχύλισης του φύκους *Haematococcus pluvialis*

Μέθοδος εκχύλισης	Παρουσία υπερήχων	Παρουσία μικροκυμάτων	Παρουσία υπερήχων και μικροκυμάτων
Συχνότητα εκχύλισης (kHz)	25	25	25
Ένταση υπερήχων (W)	450, 648	-	648
Ένταση μικροκυμάτων (W)	-	200	200
Αναλογία βιομάζας: διαλύτη (g/mL)	1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5	1:100	1:100
Χρόνος εκχύλισης (min)	5, 10, 15, 20, 30, 40	5, 10, 15, 20, 30, 40	5, 10, 15, 20, 30, 40
Διαλύτες	ακετόνη, MCT, έλαιο πορτοκαλιού	ακετόνη, MCT, έλαιο πορτοκαλιού	ακετόνη, MCT, έλαιο πορτοκαλιού
Θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	40	40	40

Η απόδοση των εκχυλίσεων όπως και στις άλλες περιπτώσεις έτσι και σε αυτή με τη χρήση οργανικών διαλυτών εκφράζεται ως το ποσοστό του ληφθέντος εκχυλίσματος σε σχέση με το ξηρό υλικό του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση, όπως περιγράφεται από την εξίσωση (1):

$$\text{Απόδοση εκχύλισης \%} = \frac{\text{Μάζα εκχυλίσματος (g)}}{\text{Μάζα ξηρού υλικού (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Πρωτόκολλο μέτρησης συνολικών καροτενοειδών

Τα εκχυλίσματα που ανακτήθηκαν από τη βιομάζα του φύκους διαλυτοποιήθηκαν σε ακετόνη έγιναν οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις και άμεσα αναλύθηκαν σε φωτόμετρο UV/ ορατού φωτός σύμφωνα με τη μέθοδο του Hamilton, 1984 [403].

Τα συνολικά καροτενοειδή υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την απορρόφηση στα 480 και 510 nm. Τα συνολικά καροτενοειδή υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση:

$$C \left(\frac{\mu\text{g ασταξανθίνης}}{\text{mL εκχυλίσματος}} \right) = (7.6 A_{480} - 1.49 A_{510}) * D (\text{Βαθμός αραιώσης εκχυλίσματος}) \quad (2)$$

Όπου C είναι το συνολικό ποσοστό των καροτενοειδών, A είναι η απορρόφηση και D ο βαθμός αραιώσης του εκχυλίσματος (εκχυλιζόμενος όγκος, ml / βάρος ξηρής μάζας που εκχυλίστηκε, mg). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g συνολικών καροτενοειδών/ g βιομάζας *H. Pluvialis*. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν τουλάχιστο εις διπλούν.

Πρωτόκολλο μέτρησης ασταξανθίνης φασματοφωτομετρικά

Τα εκχυλίσματα που ανακτήθηκαν από τη βιομάζα του φύκους *H. Pluvialis* διαλυτοποιήθηκαν σε ακετόνη σε γνωστές αραιώσεις και αναλύθηκαν άμεσα σε φωτόμετρο UV/ ορατού φωτός σύμφωνα με τη μέθοδο των Parsons et al. 1984 [402].

Για τον προσδιορισμό της ασταξανθίνης κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασταξανθίνης με βάση εκχύλισμα *Haematococcus pluvialis* περιεκτικότητας (10%) σε ασταξανθίνη το οποίο παρήχθη από την εταιρεία Algatech. Συγκεκριμένα, για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού εκχυλίσματος και τα διαλύματα φωτομετρήθηκαν στα 474 nm (μέγιστη απορρόφηση ασταξανθίνης).

Η εξίσωση που προσεγγίζει την καμπύλη αναφοράς της ασταξανθίνης είναι:

$$C \left(\frac{\mu\text{g ασταξανθίνης}}{\text{mL εκχυλίσματος}} \right) = \frac{A_{474} - 0,028}{0,2146} * \text{Βαθμός αραιώσης εκχυλίσματος} \quad (3)$$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g ασταξανθίνης / g βιομάζας *Haematococcus pluvialis*.

Επίσης, η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε ασταξανθίνη προσδιορίστηκε μέσω ανάλυσης HPLC. Με τη μέθοδο HPLC ποσοτικοποιήθηκαν μόνο τα ακετονικά διαλύματα καθώς η φύση των υπόλοιπων διαλυτών (έλαιο πορτοκαλιού, MCT) δεν επιτρέπει την είσοδο τους σε στήλη HPLC. Τα ακετονικά εκχυλίσματα υπέστησαν ενζυματική υδρόλυση και αναλύθηκαν με HPLC με σκοπό να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα των εκχυλισμάτων σε ελεύθερη ασταξανθίνη.

Ενζυματική υδρόλυση ασταξανθίνης

Η ασταξανθίνη που βρίσκεται στο φύκος *Haematococcus pluvialis* αποτελείται περίπου από 70% μονοεστέρες, 25% διεστέρες και 5% σε ελεύθερη μορφή [401]. Έτσι, η ενζυματική υδρόλυση πραγματοποιήθηκε ώστε να ποσοτικοποιηθεί η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ελεύθερη ασταξανθίνη. Η υδρόλυση των εστέρων της ασταξανθίνης στα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο χοληνεστεράση σύμφωνα με τη μέθοδο των Jacobs et al. (1982) [407]. Συγκεκριμένα, αρχικά διαλύεται κατάλληλη ποσότητα ενζύμου χοληνεστεράσης σε 50mM Tris- HCl ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα ενζύμου ενεργότητας 4units/ mL. Έπειτα, παρασκευάζεται το διάλυμα εσωτερικού προτύπου trans- beta- apo- 8'- carotenal συγκέντρωσης 0,08 mg/mL και το διάλυμα προτύπου ασταξανθίνης συγκέντρωσης 0,3 mg/mL. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα αραιώνονται σε κατάλληλη αραιώση και προστίθεται σε 1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος 1 mL διαλύματος ενζύμου και 1 mL διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Το παραπάνω διάλυμα αναδεύεται για 2 min και στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο 37°C για 2 h αναδεύοντας ανά 15 min. Με το πέρας της ενζυματικής υδρόλυσης, στο διάλυμα προστίθενται περίπου 1g NaSO₄10H₂O και 2 mL πετρελαϊκού αιθέρα και αναδεύονται για 30s και ακολούθως φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 min. Ύστερα, παραλαμβάνεται η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα και προστίθεται 1 g NaSO₄10H₂O. Ο πετρελαϊκός αιθέρας εξατμίζεται σε ρεύμα ευγενούς αερίου και στη συνέχεια προστίθενται 3 mL ακετόνης και το διάλυμα φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθεί το άλας. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -30°C έως ότου αναλυθούν περαιτέρω.

Ανάλυση HPLC

Η ανάλυση HPLC πραγματοποιήθηκε σε συσκευή HPLC Shimadzu HP 1100 Series (USA) η οποία περιέχει ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και αυτόματο δειγματολήπτη

Agilent 1200 Series. Η ασταξανθίνη αναλύθηκε σε στήλη YMC C30 (Germany) (5 m, 250 x 4.6 mm I.D.). Οι διαλύτες αποτελούνταν από μεθανόλη, βουτυλομεθυλαιθέρα και 1% υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και η ροή ήταν 1 mL/min. Η γραμμική βαθμίδωση του βουτυλομεθυλαιθέρα ήταν: 0 min, 15%; 15 min, 30%; 23 min, 80%; 27 min, 80%; 27.1 min, 15%; 35 min, 15%. Η συγκέντρωση του διαλύματος φωσφορικού οξέος ήταν σταθερή και ίση με 4%. Η ανίχνευση της ασταξανθίνης πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων σε μήκος κύματος 474 nm (Παράρτημα 6). Η ασταξανθίνη ανιχνεύθηκε με σύγκριση του εξωτερικού προτύπου (πρότυπο ασταξανθίνης) και ποσοτικοποιήθηκε με χρήση εσωτερικού προτύπου (trans-β-Apo-8'-carotenal).

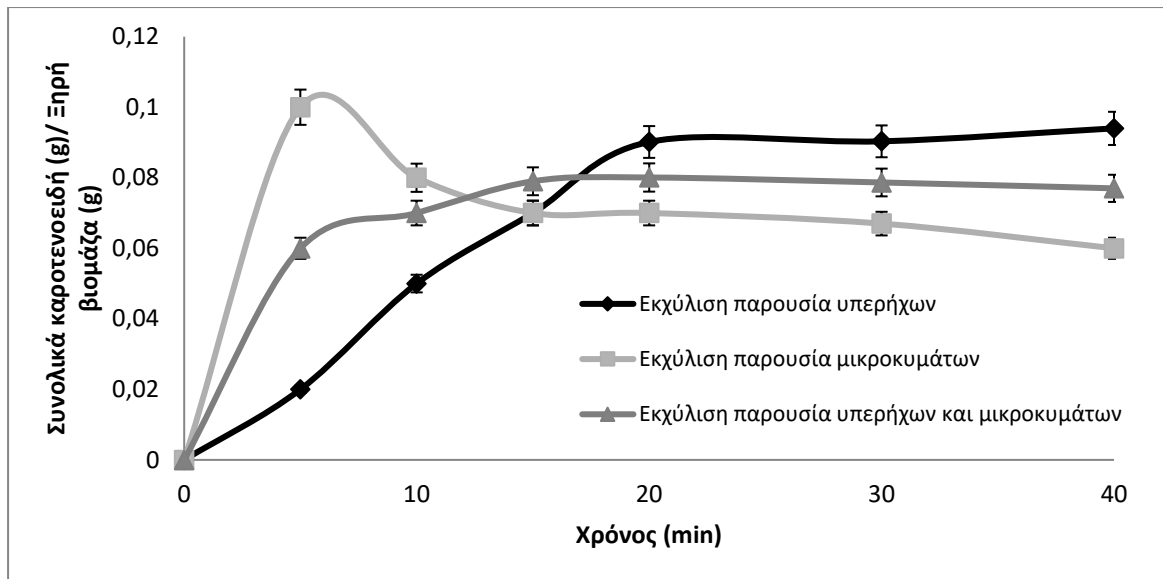
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες και το κριτήριο ελέγχου του Tukey's HSD εφαρμόστηκαν ώστε να ανιχνευθούν οι διαφορές στα καροτενοειδή και στην ασταξανθίνη των εκχυλισμάτων, λαμβάνοντας ως παράγοντες τις αναλογίες βιομάζας: διαλύτη και το διαλύτη εκχύλισης. Επιλέχθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0.05$.

6.1.1.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Η απόδοση των εκχυλίσεων και η ανάκτηση των καροτενοειδών και της ασταξανθίνης από τη βιομάζα του φύκου *Haematococcus pluvialis* εξαρτάται ισχυρά από τη φύση του διαλύτη και την τεχνική εκχύλισης. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην επιλογή της βέλτιστης τεχνικής εκχύλισης, οι εκχυλίσεις παρουσία υπερήχων, μικροκυμάτων και συνδυασμού υπερήχων και μικροκυμάτων εξετάστηκαν με κριτήριο τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης σε ασταξανθίνη και καροτενοειδή. Οι παράμετροι οι οποίες εξετάστηκαν με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης ήταν οι διαλύτες, η αναλογία βιομάζας :διαλύτη, ο χρόνος και η ένταση των υπερήχων.

Οι συνθήκες εκχύλισης και όλες οι τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν φαίνονται στον πίνακα 15. Αρχικά, με σκοπό να επιλεγεί η βέλτιστη τεχνική εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με σταθερή αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:100, με χρήση ακετόνης ως διαλύτη και σε χρόνους 5, 10, 15, 20, 30, 40 min. Στην περίπτωση εκχύλισης παρουσία υπερήχων επιλέχθηκε ως ένταση υπερήχων τα 648 W. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2. Συνολικά καροτενοειδή εκχυλισμάτων παρουσία υπερήχων (648 W), μικροκυμάτων (200 W) και συνδυασμού υπερήχων μικροκυμάτων με αναλογία βιομάζας :διαλύτη 1:100 (g/mL) με χρήση ακετόνης ως διαλύτη σε χρόνους εκχύλισης 5, 10, 15, 20, 30, 40 min σε H. Pluvialis.

Με βάση το Διάγραμμα 2, όσον αφορά στην εκχύλιση με μικροκύματα παρατηρείται ότι η ανάκτηση των καροτενοειδών παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις σε σχέση με αυτή που επιτεύχθηκε με την εκχύλιση με υπερήχους. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στα 5min εκχύλισης παρουσιάζεται η μέγιστη ανάκτηση καροτενοειδών ενώ μετά τα 5min η συγκέντρωση των καροτενοειδών μειώνεται κάτι που δε συμβαίνει στην εκχύλιση με υπερήχους που απαιτείται διπλάσιος χρόνος για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα. Η υψηλή συγκέντρωση καροτενοειδών σε σύντομο χρόνο εκχύλισης οφείλεται στο γεγονός ότι η στοχευμένη θέρμανση του διαλύτη και της βιομάζας παρουσία μικροκυμάτων επιταχύνει σημαντικά το φαινόμενο της διαβροχής και της διάχυσης των καροτενοειδών από τη βιομάζα στο διαλύτη.

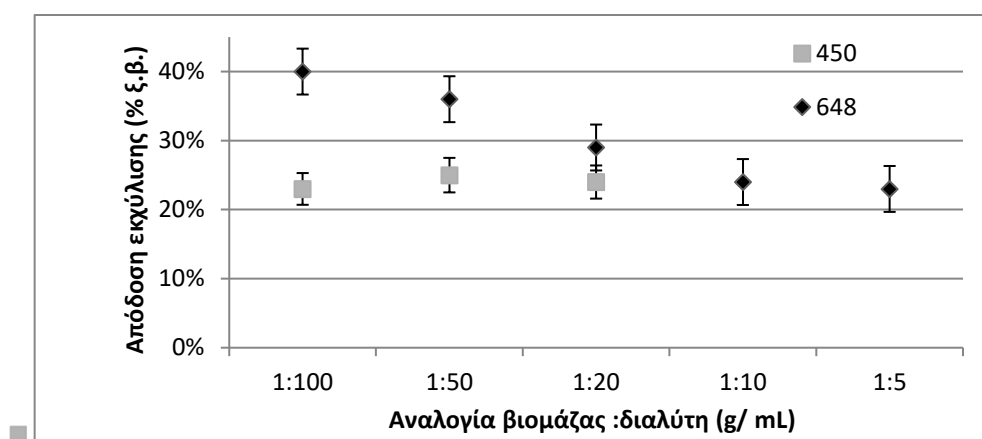
Ωστόσο, σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης η μείωση της συγκέντρωσής τους οφείλεται πιθανότατα και ως φαίνεται από τις μετρήσεις μας, στο γεγονός ότι τα καροτενοειδή που βρίσκονται στο διάλυμα, λόγω της ακτινοβολίας που δέχονται καθ' όλη την διάρκεια της εκχύλισης, υποβαθμίζονται θερμικά και έτσι μειώνεται σημαντικά το βιοδραστικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος. Επομένως, η εκχύλιση σε χρόνους μεγαλύτερους από 5min δίνει αμφίβολα αποτελέσματα και μπορεί να μειώσει το περιεχόμενο των καροτενοειδών έως και 20%.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στην περίπτωση της συνδυαστικής εκχύλισης στην οποία παρά την θερμοστάτηση του εκχυλίσματος στους 40°C, η ακτινοβολία που προέρχεται από τα μικροκύματα είχε ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των καροτενοειδών σε μεγάλους χρόνους. Όσον αφορά στην εκχύλιση με υπερήχους, παρατηρείται με βάση το Διάγραμμα 2, μία σταδιακή αύξηση των καροτενοειδών η οποία σταθεροποιείται σε χρόνο μεγαλύτερο των 20 min και μάλιστα σε τελική συγκέντρωση ελαφρώς υψηλότερη των δύο προηγούμενων μεθόδων στους ίδιους χρόνους επεξεργασίας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα της παραπάνω ανάλυσης επιλέχθηκε η εκχύλιση με υπερήχους ως η βέλτιστη τεχνική για την ανάκτηση καροτενοειδών στην οποία εξετάστηκαν κατόπιν, οι επιπλέον παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης όπως οι διαλύτες, η ένταση των υπερήχων και η αναλογία βιομάζας:διαλύτη. Ως ιδανικός χρόνος εκχύλισης παρουσία υπερήχων επιλέχθηκαν τα 20 min στα οποία παρουσιάζεται η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών.

Απόδοση εκχύλισης ακετονικών εκχυλισμάτων

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η απόδοση εκχύλισης παρουσία υπερήχων σε δυο εντάσεις (450W, 648W) με χρήση ακετόνης ως διαλύτη και σε πέντε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας:διαλύτη 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5.

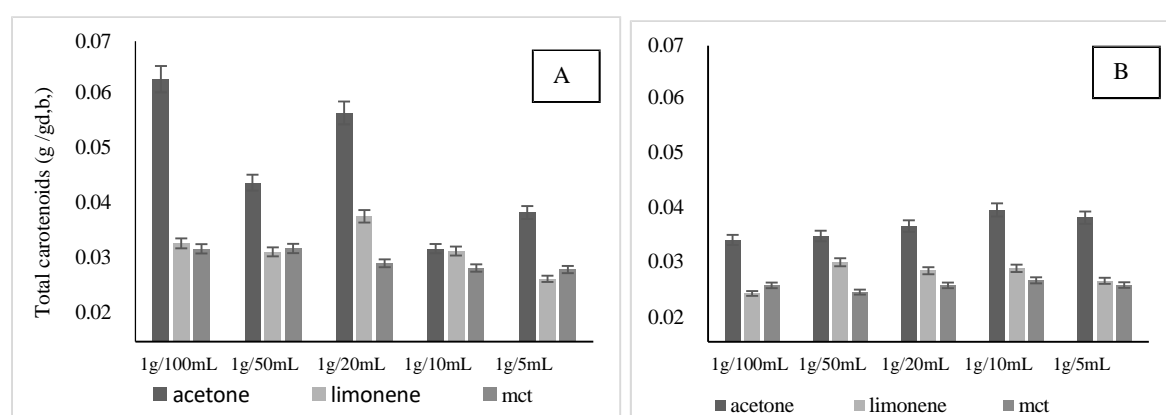


Διάγραμμα 3. Απόδοση εκχυλισμάτων σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη, σε ένταση υπερήχων 450, 648 W με χρήση ακετόνης ως διαλύτη.

Με βάση το Διάγραμμα 3 παρατηρείται ότι με την αύξηση της αναλογίας βιομάζας:διαλύτη σημειώνεται μείωση της απόδοσης εκχύλισης και στις δύο

εξεταζόμενες εντάσεις 648, 450 W. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της βιομάζας έχει ως αποτέλεσμα τον κορεσμό του διαλύτη με αποτέλεσμα να μην αυξάνεται σημαντικά η απόδοση. Επίσης συγκρίνοντας την ένταση των υπερήχων, στα 648 W σημειώνονται μεγαλύτερες αποδόσεις στις ίδιες αναλογίες βιομάζας:διαλύτη με αποτέλεσμα να θεωρηθεί πιο αποτελεσματική για την ανάκτηση ολικού εκχυλίσματος.

Στα Διαγράμματα 4 A και B παρατηρούνται τα αποτελέσματα ανάκτησης συνολικών καροτενοειδών, αντίστοιχα, στις διάφορες αναλογίες βιομάζας:διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5), εντάσεις υπερήχων (648, 450 W) και σε διαφορετικούς διαλύτες (ακετόνη, MCT, λιμονένιο).



Διάγραμμα 4. Ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε καροτενοειδή σε g ολικών καροτενοειδών / g ξηρής βιομάζας (d.b.) σε A. 648 W και B. 450 W.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με αμφίδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και δοκιμή πολλαπλού εύρους του Tukey που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης όσον αφορά την περιεκτικότητα σε καροτενοειδή και ασταξανθίνη. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό STATISTICA (Statistica Release 7, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές στο $P < 0,05$.

Σχολιάζοντας τα αποτελέσματα ανάκτησης συνολικών καροτενοειδών που περιλαμβάνουν την ασταξανθίνη, μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης, παρατηρούμε ότι η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή σχετίζεται στενά τόσο με την ισχύ των υπερήχων όσο και με την αναλογία στερεών προς διαλύτη τόσο για την ακετόνη όσο και για τα εκχυλίσματα D-λιμονενίου, ενώ τα εκχυλίσματα MCT δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά.

Όσον αφορά στους διαλύτες εκχύλισης, όπως ήταν αναμενόμενο η ακετόνη παρουσίασε την μέγιστη ανάκτηση, ωστόσο η ανάκτηση που επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τους φυσικούς διαλύτες ήταν εξίσου ικανοποιητική. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα που προέρχονται από το έλαιο πορτοκαλιού και το MCT, διαπιστώνουμε ότι το πρώτο παρουσίασε μεγαλύτερη απόδοση συνολικών καροτενοειδών.

Στα 648 W, η μείωση του διαλύτη (αύξηση της αναλογίας) προκάλεσε μείωση της απόδοσης εκχύλισης. Το γεγονός ότι η απόδοση εκχύλισης στα 648W και η αναλογία στερεού προς διαλύτη 1g/50mL (μέση τιμή: 0,026 g καροτενοειδών/g ξηρής μάζας) είναι χαμηλότερη από την απόδοση στα 648W και 1g/20mL στερεού προς διαλύτη (μέση τιμή: 0,034 g καροτενοειδών/ g ξηρής μάζας.) εξηγείται μέσω του φαινομένου της αντίστροφης ώσμωσης όπως περιγράφεται από Papadaki et al. 2014 [408].

Η ακετόνη ήταν περισσότερο αποτελεσματική από το D-λιμονένιο και το έλαιο MCT, ειδικά σε χαμηλότερες αναλογίες βιομάζας προς διαλύτες (1/100, 1/50 και 1/20), όπου τα εκχυλίσματα ακετόνης έδειξαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με αυτά ελαίου D-λιμονενίου και MCT. Μεταξύ των δύο πράσινων διαλυτών, το D-λιμονένιο ήταν πιο αποτελεσματικό δεδομένου ότι ανέκτησε μια μέση περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ίση με 0,026 g / g ξηρής μάζας, ενώ η αντίστοιχη περιεκτικότητα που ανακτήθηκε από το έλαιο MCT ήταν 0,019 g / g ξηρής μάζας και προτιμήθηκε πάνω από το έλαιο MCT λόγω της οσμής του που το καθιστά συμβατό με τρόφιμα και ποτά.

Από την άλλη, οι εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν στα 450 W είχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ίση με 0,019 g / g ξηρής μάζας και η συνολική απόδοση καροτενοειδών δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία στερεού προς διαλύτη όπως φαίνεται στο Β μέρος του διαγράμματος. Αυτή η συμπεριφορά ερμηνεύεται με την ελαφρά υπερήχηση και τη μερική διάσπαση των κυττάρων που επιτρέπει την διείσδυση των διαλυτών [409]. Η διάσπαση των κυττάρων είναι μια σημαντική παράμετρος για την αποτελεσματική εκχύλιση λόγω του γεγονότος ότι όταν η κατάρρευση των κυττάρων επεκτείνεται, ο διαλύτης αναμιγνύεται καλύτερα με τις βιοδραστικές ενώσεις [410, 343].

Επίσης, παρατηρείται ότι αυξάνοντας την ένταση των υπερήχων αυξάνεται και το σύνολο των καροτενοειδών που ανακτάται από τη βιομάζα του φύκου *Haematococcus pluvialis*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της έντασης των υπερήχων έχει ως

αποτέλεσμα την εντονότερη μηχανική καταπόνηση της βιομάζας με συνέπεια να απελευθερώνεται στο διαλύτη μεγαλύτερη ποσότητα καροτενοειδών. Συνεπώς, η αύξηση της έντασης των υπερήχων εντείνει ως αναμενόταν τα φαινόμενα διάχυσης και παραλαμβάνεται εκχύλισμα πλουσιότερο σε καροτενοειδή.

Ακολούθως έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης ασταξανθίνης στο εκχύλισμα *H. Pluvialis* με την βοήθεια υπερήχων χρησιμοποιώντας ως διαλύτες ακετόνη, MCT και λιμονένιο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ισχύ 648 και 450W. Η ασταξανθίνη βρίσκεται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης οπότε η ισχύς των υπερήχων πρέπει να διασπάσει τα τμήματα του κυττάρου σε μικρότερα τεμάχια για την καλύτερη απομόνωση αυτής. Αυτό το γεγονός δείχνει τη συσχέτιση ανάμεσα στην ισχύ και τη διάρκεια των υπερήχων και ως εκ τούτου πρέπει όλες οι παράμετροι να ληφθούν υπόψη για να επιτύχουμε την καλύτερη δυνατή εκχύλιση. Τα αποτελέσματα της εκχυλιζόμενης ασταξανθίνης και η αναλογία της ως προς τα συνολικά καροτενοειδή παρουσιάζονται στους δύο παρακάτω πίνακες 17, A και B.

Πίνακας 17. Περιεχόμενη Ασταξανθίνη ως mg/kg ξηρής μάζας και ποσοστό ασταξανθίνης σε ολικά καροτενοειδή, (A) σε 648W και (B) σε 450W

A				B			
Solvent system	Solid/solvent ratio (g/mL)	Astaxanthin content (mg/g d.b.)	Percentage of astaxanthin in total carotenoids (%)	Solvent system	Solid/solvent ratio (g/mL)	Astaxanthin content (mg/g d.b.)	Percentage of astaxanthin in total carotenoids (%)
acetone	1/100	42.45 ^a ± 0.07	69.59 ^a ± 0.11	acetone	1/100	14.28 ^a ± 0.02	62.08 ^{a,b} ± 0.10
	1/50	26.43 ^b ± 0.06	71.44 ^b ± 0.17		1/50	14.96 ^b ± 0.04	62.35 ^a ± 0.15
	1/20	40.79 ^c ± 0.03	76.97 ^c ± 0.07		1/20	17.45 ^c ± 0.01	64.63 ^c ± 0.21
	1/10	16.77 ^d ± 0.03	79.87 ^d ± 0.13		1/10	20.39 ^d ± 0.03	65.76 ^d ± 0.16
	1/5	24.37 ^e ± 0.04	81.23 ^e ± 0.14		1/5	19.39 ^e ± 0.03	66.87 ^e ± 0.11
limonene	1/100	16.92 ^d ± 0.03	61.60 ^f ± 0.10	limonene	1/100	6.00 ^f ± 0.01	44.41 ^f ± 0.07
	1/50	17.62 ^f ± 0.04	66.55 ^g ± 0.16		1/50	11.74 ^g ± 0.03	65.30 ^d ± 0.16
	1/20	25.97 ^g ± 0.06	74.46 ^h ± 0.24		1/20	10.96 ^h ± 0.04	65.83 ^d ± 0.21
	1/10	19.25 ^h ± 0.03	77.56 ^c ± 0.13		1/10	11.80 ^g ± 0.02	66.85 ^e ± 0.11
	1/5	15.91 ⁱ ± 0.05	78.90 ⁱ ± 0.26		1/5	10.00 ⁱ ± 0.03	67.86 ^e ± 0.22
MCT oil	1/100	12.94 ^j ± 0.02	76.91 ^e ± 0.13	MCT oil	1/100	5.77 ^j ± 0.01	54.50 ^h ± 0.09
	1/50	13.98 ^k ± 0.03	83.9 ^j ± 0.21		1/50	7.18 ^k ± 0.02	61.80 ^b ± 0.15
	1/20	14.15 ^l ± 0.05	89.55 ^k ± 0.29		1/20	8.56 ^l ± 0.03	64.49 ^c ± 0.05
	1/10	13.96 ^k ± 0.03	91.65 ^l ± 0.22		1/10	10.03 ⁱ ± 0.02	65.58 ^d ± 0.11
	1/5	13.4 ^m ± 0.02	93.56 ^m ± 0.15		1/5	8.14 ^m ± 0.01	66.69 ^e ± 0.11

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις, ο αριθμός (+/-) δίπλα στην τιμή δείχνει την τυπική απόκλιση και αριθμοί με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά. Η περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη έδειξε την ίδια τάση με τη συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη και το ποσοστό ασταξανθίνης στα ολικά καροτενοειδή ήταν υψηλότερα σε μικρότερες

αναλογίες με την αναλογία εκχύλισης 1:20 να είναι πιο αποτελεσματική στις περισσότερες περιπτώσεις και για τις δύο εφαρμοζόμενες ισχύς με μέση τιμή 19,65 mg ασταξανθίνης / g ξηρής μάζας. Όσον αφορά την ισχύ υπερήχων, παρατηρήθηκε ότι σε 648 W ανακτήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες (1,78 φορές υψηλότερη) του καροτενοειδούς σε σύγκριση με 450 W, ειδικά σε αναλογίες 1g / 100mL, 1g / 50mL και 1g / 20mL. Η στατιστική ανάλυση των πειραμάτων αποτυπώνεται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Σύμβολα της στατιστικής ανάλυσης των ολικών καροτενοειδών του πίνακα. Τιμές που δεν έχουν τον ίδιο εκθέτη (ξεχωριστά για A και B) είναι σημαντικά διαφορετικές ($p < 0.05$)

Solid/ solvent ratio (g/ mL)	Solvent system	Statistical analysis letters	
		at 648 W	at 450 W
1/100	acetone	A	a
	limonene	d,b,h	e
	MCT	g,c,j	j,e,g
1/ 50	acetone	b,l	a
	limonene	e,f,c	f
	MCT	g,c,j	j,e
1/ 20	acetone	a,h	a,b
	limonene	e,b,c	f,h,g
	MCT	g,n,f	j,g,e
1/ 10	acetone	c,n	a
	limonene	e,f,m,j	f,h,g
	MCT	g,n,f	j,e,g,k
1/ 5	acetone	c,j,l	c,d
	limonene	f,n	e,h
	MCT	g,n,f	j,e,g,k

Η ακετόνη ήταν και σε αυτή την περίπτωση ο διαλύτης επιτυγχάνοντας την καλύτερη απόδοση και στις δύο περιπτώσεις εφαρμοζόμενη ισχύς υπερήχων με μέση περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη ίση με 23,73 mg / g ξηρής μάζας ενώ το έλαιο MCT ανέκτησε τις χαμηλότερες ποσότητες ασταξανθίνης με μέση περιεκτικότητα 10,81 mg / g ξηρής μάζας.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι οι υπέρηχοι ασκούν μηχανική επίδραση, επιτρέποντας μεγάλη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα, αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής μεταξύ της στερεάς και υγρής φάσης. Ως συνέπεια, η ασταξανθίνη διαχέεται πλέον ευκολότερα και γρήγορα από τη στερεά φάση στο διαλύτη [409]. Σημαντική παρατήρηση ωστόσο είναι ότι η συνολική εκχυλιζόμενη ποσότητα ασταξανθίνης δείχνει να μην επηρεάζεται σημαντικά από την αναλογία βιόμαζας / διαλύτη. Ωστόσο η αναλογία της ασταξανθίνης στα ολικά καροτενοειδή φαίνεται ότι αυξάνεται όσο αυξάνεται συγκέντρωση βιόμαζας στον διαλύτη.

Επίσης, όπως παρατηρείται και στα καροτενοειδή, η ένταση των υπερήχων στα 648 W παρουσίασε μεγαλύτερη ανάκτηση ασταξανθίνης εξαιτίας της έντονης καταπόνησης του δείγματος. Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα συμπεραίνεται ότι η βέλτιστη ένταση υπερήχων για την ανάκτηση καροτενοειδών και ασταξανθίνης από την αρχική βιομάζα του φύκους είναι τα 648 W.

Πίνακας 19. Συγκέντρωση ασταξανθίνης ως προς 1 mL εκχυλίσματος μέσω εκχύλισης με υπερήχους προερχόμενο από αναλογίες βιομάζας :διαλύτη 1:10 και 1:5, στα 648 και 450 W με χρήση ακετόνης ως διαλύτη.

Ένταση υπερήχων	Αναλογία βιομάζας (g) : διαλύτη (mL)	Συγκέντρωση ασταξανθίνης (mg/mL)
648	1:10	2.13
450		3.14
648	1:5	6.85
450		6.04

Στον παραπάνω Πίνακα 19 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ασταξανθίνης ως προς 1 mL εκχυλίσματος μέσω εκχύλισης με υπερήχους προερχόμενο από αναλογίες βιομάζας : διαλύτη 1:10 και 1:5, στα 648 και 450 W με χρήση ακετόνης ως διαλύτη. Όπως διαπιστώνεται, η συγκέντρωση ασταξανθίνης ανά mL εκχυλίσματος είναι υψηλότερη σε μεγαλύτερες αναλογίες βιομάζας: διαλύτη ενώ η αναλογία 1:5 είναι πιο αποτελεσματική για την ανάκτηση εκχυλισμάτων πλούσιων σε ασταξανθίνης και για τις δυο εντάσεις υπερήχων από ότι η 1:10. Όσον αφορά την ένταση υπερήχων, τα εκχυλίσματα που ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας ως ένταση υπερήχων 648 W παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση σε ασταξανθίνη σε αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:5.

6.1.1.3 Σχολιασμός αποτελεσμάτων ανάκτησης ασταξανθίνης μέσω HPLC ανάλυσης

Όπως προαναφέρθηκε, η συγκέντρωση ασταξανθίνης μέσω ανάλυσης HPLC πραγματοποιήθηκε μόνο στα ακετονικά διαλύματα καθώς η φύση των υπόλοιπων διαλυτών δεν επιτρέπει την είσοδο τους στη στήλη HPLC.

Παρά τα υψηλά ποσοστά ασταξανθίνης που παρουσιάζονται με τη χρήση ακετόνης ως διαλύτη, η χρήση της σε προϊόντα τροφίμων είναι απαγορευτική. Έτσι, οι φυσικοί διαλύτες αποτελούν εναλλακτική επιλογή καθώς παρουσίασαν ικανοποιητικές αποδόσεις συγκρίσιμες με εκείνες των εκχυλισμάτων ακετόνης. Ειδικότερα, το έλαιο πορτοκαλιού (limonene) παρουσιάζει ανάκτηση της τάξης του 86% σε σχέση με το αντίστοιχο εκχύλισμα ακετόνης ποσοστό αρκετά ικανοποιητικό λαμβάνοντας υπόψη ότι αξιοποιείται ένα σημαντικό προϊόν της βιομηχανίας χυμοποίησης. Το D-λιμονένιο προτείνεται ως το προτιμώμενο σύστημα διαλυτών προς την ακετόνη και το έλαιο MCT τόσο για επαρκή ανάκτηση καροτενοειδών όσο και κυρίως για την ικανότητά του να εκχυλίζει καροτενοειδή χωρίς ανεπιθύμητη οσμή που επιτρέπει την άμεση χρήση των αναπτυγμένων εκχυλισμάτων σε τελικά προϊόντα τροφίμων.

Συνολικά, η υψηλότερη απόδοση επιτυγχάνεται στα 648 Watt για όλα τα συστήματα και τις αναλογίες διαλυτών, υποδεικνύοντας την σημασία της ισχύος υπερήχων. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να σημειωθεί ότι ο φορέας του εκχυλίσματος είναι από το ίδιο το προϊόν γεγονός που οδηγεί σε προϊόντα «καθαρής ετικέτας» χωρίς να περιλαμβάνονται άλλα πρόσθετα σε μια σειρά προϊόντων. Άρα η σχετικά μικρότερη απόδοση εκχύλισης αντισταθμίζεται από τα οφέλη τόσο της πράσινης ετικέτας του προϊόντος όσο και της δυνατότητας για άμεση και απευθείας χρήση χωρίς άλλη περαιτέρω επεξεργασία.

Η φύση του ελαίου πορτοκαλιού (λιμονένιο) το καθιστά επίσης κατάλληλο για την ενσωμάτωση του εκχυλίσματος σε προϊόντα χυμών που θα δοκιμαστούν ερευνητικά στην παρούσα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, θεωρείται ότι η εκχύλιση παρουσία υπερήχων με συχνότητα 25 kHz και ένταση 648 W σε αναλογία 1:20mL και σε χρόνο εκχύλισης 20 min είναι η πλέον αποτελεσματική για την ανάκτηση καροτενοειδών και ασταξανθίνης και για την ενσωμάτωση αυτών των εκχυλισμάτων σε προϊόντα τροφίμων αλλά και ειδικότερα σε αυτά της κατηγορία των χυμών και αναψυκτικών.

6.2 Υπερκρίσιμη εκχύλιση

6.2.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Το πρότυπο ασταξανθίνης αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma Chemical (USA). Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια ήταν ποιότητας κατάλληλης HPLC. Η ξηρή βιομάζα από το φύκος *Haematococcus pluvialis* παραχωρήθηκε από την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel).

Μέθοδοι

Υπερκρίσιμη εκχύλιση

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε διάταξη υπερκρίσιμης εκχύλισης CO₂ η οποία βρίσκεται στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Algatechnologies Ltd (Israel) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2. Ζυγίστηκαν 1,3 kg του φύκους *Haematococcus pluvialis* και τοποθετήθηκαν στο δοχείο εκχύλισης χωρητικότητας 5L. Η ροή του υπερκρίσιμου CO₂ ρυθμίστηκε σε 10 L/h. Η αιθανόλη επιλέχθηκε ως συνδιαλύτης και η ροή του συνδιαλύτη ορίστηκε 2 L/h. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 5 ώρες.

Ακολούθως, το εκχυλιζόμενο ρεύμα από τον εκχυλιστήρα αποσυμπιέστηκε μέσω δύο μειωτήρων (ρυθμιστών) πίεσης και συλλέχθηκε από τους δύο διαχωριστές σε διάστημα 1h μέσα σε σκουρόχρωμους δοκιμαστικούς σωλήνες για την πρόληψη της φωτοαποδόμησης. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ανάκτησης ασταξανθίνης ήταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, η πίεση και η θερμοκρασία όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 20.



Separator 1: Σημείο συλλογής εκχυλίσματος. Η πίεση στο δοχείο συλλογής είναι 50 bar και η θερμοκρασία 60-65°C.

Separator 2: Χρησιμοποιείται για την εξάτμιση πτητικών ουσιών, και για τη μετατροπή του CO₂ από υγρό σε αέριο.

Extractor 5L (1.3Kg biomass)

Separator 1 (Oleo-resin collection)

Separator 2

Εικόνα 14. Διάταξη υπερκρίσιμης εκχύλισης

Πίνακας 20. Παράμετροι σχεδιασμού υπερκρίσιμης εκχύλισης

Παράμετροι Λειτουργίας	Πίεση εκχύλισης (bar)	Περιεκτικότητα αιθανόλης (mL/g)	Θερμοκρασία εκχύλισης (°C)
Πειραματικός σχεδιασμός	300, 350, 400, 450, 500	0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5	35, 45, 55, 65,75

Εκχύλιση Soxhlet

Η συνολική ποσότητα ασταξανθίνης που περιέχεται στο φύκος *Haematococcus pluvialis* προσδιορίστηκε μέσω της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet. Η εκχύλιση Soxhlet πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 45 °C. Εκχυλίστηκε 1g ξηρής βιομάζας *Haematococcus pluvialis* σε 200 mL διχλωρομεθάνιο έως ότου το χρώμα του διαλύτη στην κορυφή της συσκευής εκχύλισης γίνει διαυγές.

Απόδοση εκχύλισης

Η απόδοση εκχύλισης με CO₂ ορίζεται ως ο λόγος της ποσότητας ασταξανθίνης του εκχυλίσματος που προέρχεται από την υπερκρίσιμη εκχύλιση προς τη συνολική ποσότητα ασταξανθίνης που λαμβάνεται μέσω της εκχύλισης Soxhlet που λαμβάνεται ως η ανάκτηση αναφοράς [441].

Σαπωνοποίηση των εστέρων της ασταξανθίνης

Η σαπωνοποίηση πραγματοποιήθηκε ώστε να υδρολυθούν οι εστέρες της ασταξανθίνης και να ποσοτικοποιηθεί η ελεύθερη ασταξανθίνη. Συγκεκριμένα, οι εστέρες διαλυτοποιήθηκαν σε CH₂Cl₂ και 1% KOH σε MeOH (1 ml) που προστέθηκε σε συνθήκες ατμόσφαιρας αζώτου. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και στη συνέχεια σε θερμοκρασία 5 °C για 12 h. Μετά την υδρόλυση, το διάλυμα εξουδετερώθηκε με 1% aq. NH₄Cl και η ασταξανθίνη απομονώθηκε με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση διηθήθηκε μέσω κλίνης Na₂SO₄ (για να απομακρυνθεί η υπολειμματική υδατική φάση) και εξατμίστηκε υπό ατμόσφαιρα N₂. Το σαπωνοποιημένο εκχύλισμα τότε διαλύθηκε σε ακετόνη η οποία περιείχε 0.2 wt% BHT. Το διάλυμα στη συνέχεια διηθήθηκε και εγχύθηκε στο σύστημα HPLC.

HPLC ανάλυση των εκχυλισμάτων

Τα σαπωνοποιημένα εκχυλίσματα εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC με LC-10AD αντλία και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων SPD-M10A (Shimadzu, Japan) ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ασταξανθίνης. Τα πρότυπα και σαπωνοποιημένα διαλύματα διαλύθηκαν στο σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο: μεθανόλη (1:3, v/v) και διαχωρίστηκαν με μια στήλη αντίστροφης φάσης C18-MS Waters column (5 μm ; 4.6 \times 150 mm; Nacalai Tesque, Inc., Japan) σε θερμοκρασία 30 °C. Ισοκρατική έκλουση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μεθανόλη: ακετονιτρίλιο: διχλωρομεθάνιο: νερό (85:5:5:5, v/v) ως κινητή φάση. Η ροή ρυθμίστηκε 1.2 mL/min και το μήκος κύματος ανιχνεύσεως ορίστηκε 480 nm.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

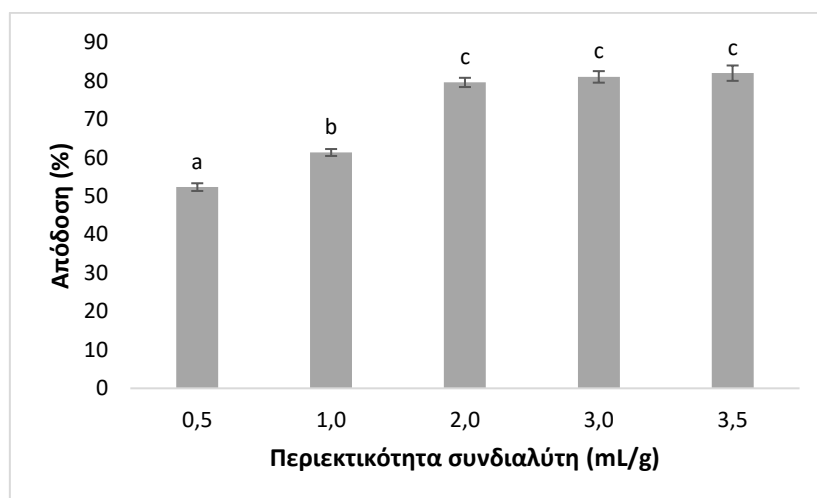
Η ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες και το κριτήριο ελέγχου του Tukey's HSD εφαρμόστηκαν ώστε να ανιχνευθούν οι διαφορές στην απόδοση της ασταξανθίνης των εκχυλισμάτων λαμβάνοντας ως παράγοντες την περιεκτικότητα σε συνδιαλύτη, την πίεση και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Επιλέχθηκε πάλι το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0,05$.

6.2.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

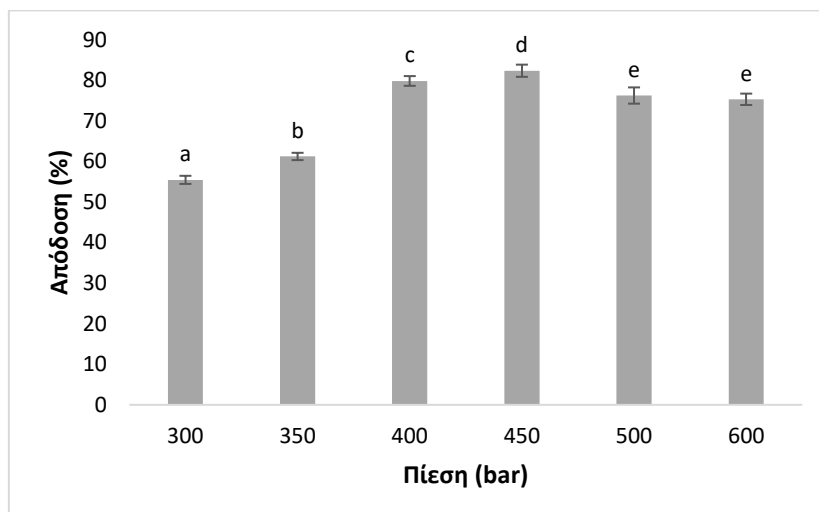
Υπερκρίσιμη εκχύλιση και απόδοση ασταξανθίνης

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η επίδραση της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη (Α), της πίεσης (Β) και της θερμοκρασίας (Γ) στην απόδοση της ασταξανθίνης.

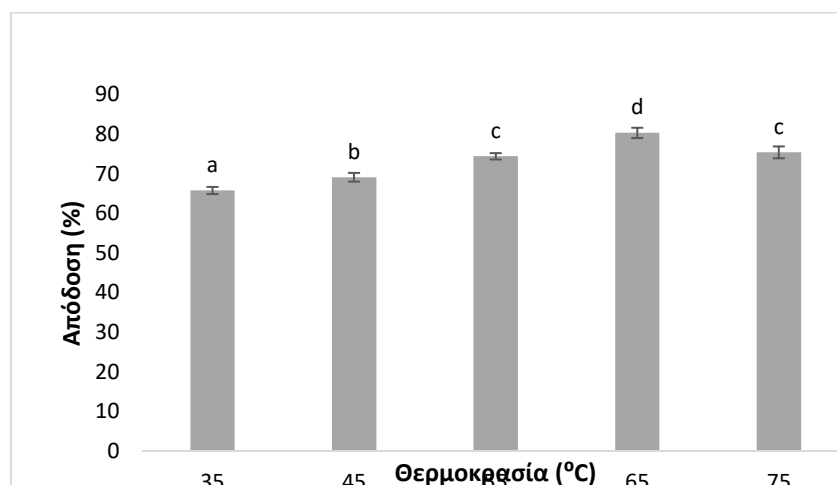
Α.



B.



Γ.



Διάγραμμα 5. Επίδραση της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη (A), της πίεσης (B) και της θερμοκρασίας (Γ) στην απόδοση της ασταξανθίνης από το φύκος *Haematococcus pluvialis*. Για την παράμετρο της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη, οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας ορίστηκαν σε 400 bar και 65 °C, αντίστοιχα. Για την παράμετρο της πίεσης, η περιεκτικότητα του συνδιαλύτη και η θερμοκρασία ορίστηκαν σε 2.0 mL/g και 65 °C, αντίστοιχα. Για την παράμετρο της θερμοκρασίας, η περιεκτικότητα του συνδιαλύτη και η πίεση ορίστηκαν σε 2.0 mL/g και 400 bar, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($p < 0.05$).

Η αύξηση της περιεκτικότητας του συνδιαλύτη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην απόδοση της ασταξανθίνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το διοξείδιο του άνθρακα δεν αποτελεί κατάλληλο διαλύτη για την ανάκτηση πολικών ενώσεων και ο μηχανισμός για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του διοξειδίου του άνθρακα είναι η προσθήκη κάποιου συνδιαλύτη ώστε να βελτιωθεί η πολικότητά του. Οι Machmudah et al. (2006) ανέφεραν ότι η προσθήκη αιθανόλης μπορεί να ενισχύσει

κατά δυο φορές την ανάκτηση της ασταξανθίνης από το φύκος *Haematococcus pluvialis* κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση [411].

Με βάση το Διάγραμμα 5(A), η απόδοση της ασταξανθίνης όταν χρησιμοποιήθηκε περιεκτικότητα συνδιαλύτη 2.0 mL/g ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p < 0.05$) από ότι στα 1.0 mL/g αλλά δε διέφερε ($p > 0.05$) σημαντικά όταν εφαρμόστηκε συγκέντρωση 3.0 mL/g. Η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απόδοση της ασταξανθίνης παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 5 (B) και (Γ). Η απόδοση της ασταξανθίνης αυξήθηκε μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή με την αύξηση της πίεσης και στη συνέχεια μειώθηκε. Χαμηλότερη ή υψηλότερη τιμή πίεσης από τα 450 bar οδήγησε σε μείωση της απόδοσης σε ασταξανθίνη. Η θερμοκρασία είχε αντίστοιχη επίδραση με την πίεση στην απόδοση της ασταξανθίνης και η απόδοση στους 65 °C ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p < 0.05$) από ότι στις άλλες θερμοκρασίες. Στην υπερκρίσιμη εκχύλιση, η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία μεταξύ της πυκνότητας του ρευστού και της τάσης ατμών της διαλυμένης ουσίας, οι οποίες ελέγχονται από τη θερμοκρασία και την πίεση (Thana et al., 2008)[412].

Η αύξηση στην πίεση οδηγεί σε αύξηση της πυκνότητας του ρευστού με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαλυτότητα των ενώσεων. Από την άλλη μεριά, όταν η θερμοκρασία αυξάνεται, η πυκνότητα του ρευστού μειώνεται ωστόσο η τάση ατμών της διαλυμένης ουσίας αυξάνεται. Έτσι, η διαλυτότητα της διαλυμένης ουσίας μπορεί είτε να αυξηθεί, είτε να μειωθεί, είτε να παραμείνει σταθερή. Επομένως, η συσχέτιση πίεσης και θερμοκρασίας αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο για τον έλεγχο της χημικής σύνθεσης του εκχυλίσματος.

Τέλος, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης προκύπτουν να είναι περιεκτικότητα σε συνδιαλύτη (αιθανόλη) 2.0 mL/g, πίεση 450 bar και θερμοκρασία 65 °C στις οποίες επιτεύχθηκε η μέγιστη ανάκτηση ασταξανθίνης, 87,42%.

6.3 Εκχύλιση Ασταξανθίνης με μικρογαλακτώματα

6.3.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Η ξηρή βιομάζα από το φύκος *Haematococcus pluvialis* και παραχωρήθηκαν από την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel). Ο αιθοξυλιωμένος εστέρας της σορβιτάνης Tween 60 (ethoxylated- 20 EO-sorbitan monostearate) ήταν εμπορικής ποιότητας και αγοράστηκε από τη Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Το έλαιο πορτοκαλιού (98%) προμηθεύτηκε από τη Sigma Chemical Co και την Aspis SA. Η αιθανόλη, η γλυκερόλη και η προπυλενογλυκόλη παραλήφθηκαν από τη Frutarom (Haifa, Israel). Τα υλικά χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν διπλά αποσταγμένο.

Μέθοδοι

Πειράματα εκχύλισης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μικρογαλακτωμάτων στο Hebrew University of Jerusalem (Ισραήλ) και χαρακτηρίστηκε η δομή τους καθώς επίσης και η ικανότητα διαλυτοποίησης της ασταξανθίνης στα διάφορα μικρογαλακτώματα. Με βάση τα αποτελέσματα επιλέχθηκε το γαλάκτωμα νερού/προπυλενογλυκόλης/έλαιο πορτοκαλιού/Tween 60 σε σταθερή αναλογία νερού/ προπυλενογλυκόλης (1:1) και σταθερή αναλογία ελαίου πορτοκαλιού/ αιθανόλης (1:1) ως μέσο εκχύλισης καθώς σε αυτό παρουσιάστηκε η μέγιστη σταθερότητα και ικανότητα διαλυτοποίησης.

Το φύκος *Haematococcus pluvialis* εκχυλίστηκαν στο Hebrew University of Jerusalem (Ισραήλ) χρησιμοποιώντας τη συσκευή Silverson Homogenizer και οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας:διαλύτη. Συγκεκριμένα, οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρόνους 2.5, 5, 10, 20, 60 min σε σταθερή αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:5 και στον βέλτιστο χρόνο πραγματοποιήθηκαν επιπλέον εκχυλίσεις μεταβάλλοντας την αναλογία βιομάζας: διαλύτη (1:3, 1:5, 1:10, 1:15). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C.

Απόδοση εκχύλισης με μικρογαλακτώματα

Η απόδοση εκχύλισης με μικρογαλακτώματα εκφράζεται με βάση την παρακάτω Εξίσωση (3).

% Αποτελεσματικότητα εκχύλισης = εκχύλιση ασταξανθίνης/αρχική περιεχόμενη τιμή (3)

Σαπωνοποίηση των εστέρων της ασταξανθίνης

Η σαπωνοποίηση πραγματοποιήθηκε ώστε να υδρολυθούν οι εστέρες της ασταξανθίνης και να ποσοτικοποιηθεί η ελεύθερη ασταξανθίνη. Συγκεκριμένα, οι εστέρες διαλυτοποιήθηκαν σε CH₂Cl₂ και 1% KOH σε MeOH (1 ml) προστέθηκε κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και στη συνέχεια σε 5 °C διάρκεια 12 h. Μετά την υδρόλυση, το διάλυμα εξουδετερώθηκε με 1% aq. NH₄Cl και η ασταξανθίνη απομονώθηκε με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση διηθήθηκε μέσω κλίνης Na₂SO₄ (για να απομακρυνθεί η υπολειμματική υδατική φάση) και εξατμίστηκε υπό ατμόσφαιρα N₂. Το σαπωνοποιημένο εκχύλισμα τότε διαλύθηκε σε ακετόνη η οποία περιείχε 0.2 wt% BHT. Το διάλυμα στη συνέχεια διηθήθηκε και εγχύθηκε στο σύστημα HPLC.

HPLC ανάλυση των εκχυλισμάτων

Τα σαπωνοποιημένα εκχυλίσματα εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC με LC-10AD αντλία και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων SPD-M10A (Shimadzu, Japan) ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στα εκχυλίσματα. Τα πρότυπα και σαπωνοποιημένα διαλύματα διαλύθηκαν στο σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο: μεθανόλη (1:3, v/v) και διαχωρίστηκαν με μια στήλη αντίστροφης φάσης C18-MS Waters column (5 μm; 4.6×150 mm; Nacalai Tesque, Inc., Japan) σε θερμοκρασία 30 °C. Ισοκρατική έκλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μεθανόλη: ακετονιτρίλιο: διχλωρομεθάνιο: νερό (85:5:5:5, v/v) ως κινητή φάση. Η ροή ρυθμίστηκε 1.2 mL/min και το μήκος κύματος ανιχνεύσεως ορίστηκε 480 nm.

6.3.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην ανάκτηση ασταξανθίνης

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα καθώς και η απόδοση της εκχύλισης με μικρογαλακτώματα συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης σε σταθερή αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5.

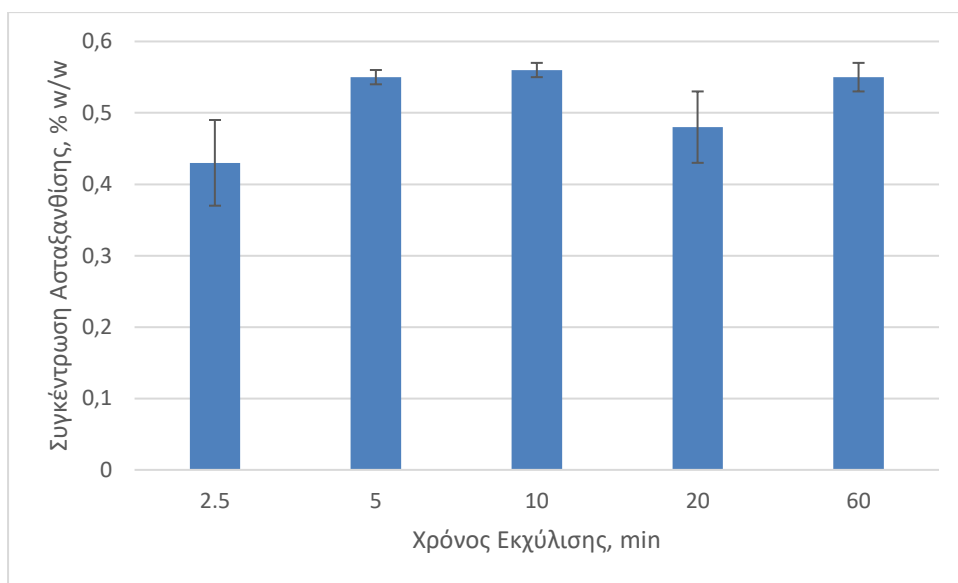
Πίνακας 21. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην ανάκτηση ασταξανθίνης σε σταθερή αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5

Χρόνος [min]	Συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα [%w/w]	Απόδοση εκχύλισης με μικρογαλακτώματα [%]
2.5	0.43 (±0.06)	61.9 (±9.5)
5	0.55 (±0.01)	78.6 (±1.4)
10	0.56 (±0.01)	79.5 (±0.8)

20	0.48 (± 0.05)	69.4 (± 7.0)
60	0.55 (± 0.02)	78.1 (± 2.2)

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 21 που αποτυπώνονται και στο Διάγραμμα 6 παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα αυξάνεται έως και τα 10 min και σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, περίπου 1h, σταθεροποιείται.

Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση Ασταξανθίνης (% w/w) στο μικρογαλάκτωμα εκχύλισης



Η ίδια τάση εμφανίζεται και στην απόδοση της εκχύλισης όπου στα 10 min παρουσιάζεται η μέγιστη τιμή της ίση με 79.5 (± 0.8) %. Με βάση τα παραπάνω βέλτιστο χρόνο εκχύλισης αποτελούν τα 10 min, στα οποία πραγματοποιήθηκαν επιπλέον εκχυλίσεις μεταβάλλοντας την αναλογία βιομάζας: διαλύτη (1:3, 1:5, 1:10, 1:15). Μεγαλύτερη αύξηση εκχυλιζόμενων καροτενοειδών παρατηρείται ή μπορεί να συμβαίνει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του γαλακτώματος και του επεξεργαζόμενου φύκους σε αρκετά μεγαλύτερους χρόνους μετά από πέντε ή και έξι ημέρες [413].

Επίδραση της αναλογίας βιομάζας: διαλύτη στην ανάκτηση ασταξανθίνης

Στον Πίνακα 22 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα καθώς και η απόδοση της εκχύλισης με μικρογαλακτώματα συναρτήσει της αναλογίας βιομάζας:διαλύτη σε σταθερό χρόνο εκχύλισης (10 min).

Πίνακας 22. Επίδραση της αναλογίας βιομάζας: διαλύτη στην ανάκτηση ασταξανθίνης σε σταθερό χρόνο εκχύλισης (10 min)

Αναλογία βιομάζας: διαλύτη	Συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα [%w/w]	Απόδοση εκχύλισης με μικρογαλακτώματα [%]
1:3	0.80 (± 0.05)	68.9 (± 4.0)
1:5	0.53 (± 0.05)	76.2 (± 7.2)
1:10	0.28 (± 0.01)	81.0 (± 1.7)
1:15	0.19 (± 0.01)	82.9 (± 2.5)

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα αυξάνεται όσο η αναλογία βιομάζας: διαλύτη αυξάνεται. Ωστόσο, η απόδοση εκχύλισης μειώνεται με την αύξηση της αναλογίας βιομάζας: διαλύτη γεγονός που οφείλεται στον κορεσμό του διαλύτη. Η αναλογία 1:3 παρουσιάζει τη μέγιστη ανάκτηση ασταξανθίνης και την ελάχιστη απόδοση εκχύλισης 68.9 (± 4.0). Έτσι, ως βέλτιστη αναλογία εκχύλισης επιλέγεται η 1:5 στην οποία η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα είναι 0.53 (± 0.05) % w/w και η απόδοση 76.2 (± 7.2).

Επιπλέον, τρεις κύκλοι εκχύλισης, τη μια φορά με το ίδιο γαλάκτωμα και καινούργια βιομάζα και την άλλη φορά με την ίδια βιομάζα και καινούργιο γαλάκτωμα, πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να αυξηθεί η ανάκτηση της ασταξανθίνης από το φύκος *Haematococcus pluvialis*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 23 και 24.

Πίνακας 23. Συγκέντρωση ασταξανθίνης σε τρεις κύκλους εκχύλισης με μικρογαλακτώματα. Κάθε κύκλος πραγματοποιήθηκε σε αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5, σε χρόνο εκχύλισης 10 min.

	Συγκέντρωση Ασταξανθίνης Κύκλος 1 [%w/w]	Συγκέντρωση Ασταξανθίνης Κύκλος 2 [%w/w]	Συγκέντρωση Ασταξανθίνης Κύκλος 3 [%w/w]
Ίδιο γαλάκτωμα /καινούργια βιομάζα	0.59 (± 0.10)	1.10 (± 0.08)	1.63 (± 0.01)
Ίδια βιομάζα /καινούργιο γαλάκτωμα	0.45 (± 0.05)	0.08 (± 0.01)	0.06 (± 0.04)

Πίνακας 24. Απόδοση σε τρεις κύκλους εκχύλισης με μικρογαλακτώματα. Κάθε κύκλος πραγματοποιήθηκε σε αναλογία βιομάζας: διαλύτη 1:5, σε χρόνο εκχύλισης 10 min.

	Απόδοση Κύκλος 1 [%]	Απόδοση Κύκλος 2 [%]	Απόδοση Κύκλος 3 [%]	Συνολική Απόδοση [%]
Ίδιο γαλάκτωμα /καινούργια βιομάζα	76.4 (±5.1)	72.4 (±21.4)	72.9 (±12.1)	73.9 (±12.9)
Ίδια βιομάζα /καινούργιο γαλάκτωμα	63.8 (±6.6)	30.7 (±3.7)	31.8 (±14.8)	75.9 (±3.2)

Με βάση τους Πίνακες 23 και 24, παρατηρείται ότι στην περίπτωση χρήσης ίδιου γαλακτώματος και καινούργιας βιομάζας η συγκέντρωση της ασταξανθίνης αυξάνεται σε κάθε κύκλο εκχύλισης και η απόδοση εκχύλισης παραμένει σχεδόν σταθερή, με τον πρώτο κύκλο να εμφανίζει τη μέγιστη απόδοση. Στην περίπτωση χρήσης ίδιας βιομάζας και καινούργιου γαλακτώματος η συγκέντρωση ασταξανθίνης και η απόδοση είναι μικρότερη σε σχέση με τη χρήση ίδιου γαλακτώματος και καινούργιας βιομάζας. Επίσης παρατηρείται ότι η ανάκτηση της ασταξανθίνης μετά τον πρώτο χρόνο εκχύλισης είναι σημαντικά μικρότερη ($p < 0.05$).

6.4 Εκχυλίσματα EPA, DHA και άλλων ω-3 λιπαρών οξέων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*

Το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι γνωστά για τις ωφέλιμες ιδιότητες τους στην υγεία του ανθρώπου. Όπως και στην περίπτωση του φύκου *Haematococcus pluvialis*, όταν το διάτομο αναπτυχθεί υπό δυσμενείς συνθήκες παράγει λιπαρά οξέα τα οποία αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις έως και 70% της ξηρής βιομάζας του (Ward and Singh, 2005)[414]. Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι τα ω-3 λιπαρά οξέα στα οποία ανήκει το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) στο οποίο αναφερθήκαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Το EPA αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα λιπαρά οξέα λόγω των θετικών του επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου, όπως η μείωση των ασθενειών που σχετίζονται με την καρδιά, καθώς και η αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδης δράση του [415].

Η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με σύγχρονες μεθόδους εκχύλισης όπως εκχύλιση παρουσία Υπερήχων και Μικροκυμάτων, εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και εκχύλιση με μικρογαλακτώματα. Ως διαλύτες εκχύλισης επιλέχθηκαν τόσο συμβατικοί διαλύτες (αιθανόλη και μεθανόλη) όσο και φυσικοί (MCT και έλαιο πορτοκαλιού).

6.4.1 Εκχύλιση παρουσία Υπερήχων, Μικροκυμάτων και συνδυασμού Υπερήχων και Μικροκυμάτων (ΕΥΜ)

6.4.1.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Η ξηρή βιομάζα από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* παραχωρήθηκε από την εταιρεία Algatechnologies Ltd. Όλοι οι διαλύτες και τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις και στις αναλύσεις ήταν αναλυτικής ποιότητας. Η μεθανόλη, αιθανόλη, το τολουόλιο, το ακετυλοχλωρίδιο, το εξάνιο, το ισοοκτάνιο και το θειικό νάτριο αγοράστηκαν από την εταιρεία Fisher Scientific, UK. Το MCT και το έλαιο πορτοκαλιού παραλήφθηκαν από την εταιρεία Aspis SA.

Μέθοδοι

Πειράματα εκχύλισης

Το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* εκχυλίστηκε παρουσία υπερήχων σε χρόνους 5, 20, 40 min με σκοπό να βελτιστοποιηθεί ο χρόνος εκχύλισης. Στη συνέχεια, στο βέλτιστο χρόνο εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με διαφορετικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη, MCT και έλαιο πορτοκαλιού) σε δύο αναλογίες βιομάζας: διαλύτη (1:10, 1:5) ώστε να επιλεγούν τόσο οι αποδοτικότεροι διαλύτες όσο και η βέλτιστη αναλογία εκχύλισης για την ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Κατόπιν, έχοντας επιλέξει τους αποδοτικότερους διαλύτες και την βέλτιστη αναλογία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε νέα εκχύλιση παρουσία υπερήχων σε ένταση αυτών 100 και 250W και μετά εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων σε ένταση μικροκυμάτων 200 και, 380W με σκοπό να επιλεγούν οι καταλληλότερες συνθήκες εκχύλισης. Τέλος, επιλέχθηκε η πλέον αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης ως συνδυασμός των παραπάνω παραμέτρων σε όρους ανάκτησης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές για κάθε συνθήκη. Στην

Εικόνα 3 παρουσιάζονται τα εκχυλίσματα του διάτομου *Phaeodactylum tricornutum* μέσω εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους.



Εικόνα 15. Εκχυλίσματα του διάτομου *Phaeodactylum tricornutum* μέσω εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους

Η απόδοση των εκχυλίσεων στην περίπτωση χρήσης οργανικών διαλυτών εκφράζεται με βάση την Εξίσωση 4.

% Αποτελεσματικότητα εκχύλισης = εκχύλιση PUFA/αρχική περιεχόμενη τιμή (4)

Ανάλυση λιπαρών οξέων

Άμεση μέθοδος μεθεστεροποίησης

Αρχικά λαμβάνονται 100μL εκχυλίσματος τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινους σωλήνες. Στη συνέχεια, προστίθενται 5mL μεθανόλης/ τολουολίου (3:2 v/v) και 5mL ακετυλοχλωριδίου/ μεθανόλης (1:20 v/v). Για την αποφυγή οξείδωσης των λιπαρών οξέων η αντίδραση εστεροποίησης λαμβάνει μέρος σε ατμόσφαιρα αζώτου. Έπειτα, οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο των 100°C για 1h. Μετά το πέρας της 1h αφήνονται τα δείγματα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθενται 5 mL HPLC νερό και 5mL εξάνιο. Μεταφέρονται τα δείγματα σε σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκεντρώνονται στις 3000rpm για 5min. Ακολούθως, η υπερκείμενη φάση των φυγοκεντρημένων δειγμάτων του εξανίου μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί απομάκρυνση της υγρασίας τους, φιλτράροντας τα δείγματα στη συσκευή διήθησης υπό κενό στην οποία έχει ήδη προστεθεί θειικό

νάτριο. Ακολουθεί πλήρης εξάτμιση των δειγμάτων σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Buchi Rotavapor) υπό κενό και με χρήση αζώτου. Τέλος, οι μεθυλεστέρες των δειγμάτων παραλαμβάνονται προσθέτοντας 1mL ισοοκτανίου και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους στον αέριο χρωματογράφο.

Αέρια χρωματογραφία προσδιορισμού λιπαρών οξέων

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν μέσω αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως εξωτερικό πρότυπο το μείγμα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων SupelcoTM 37 FAME Mix και εσωτερικό πρότυπο για ποσοτικοποίηση το λιπαρό οξύ 19:0. Ο αέριος χρωματογράφος που έγινε η ανάλυση ήταν τύπου Varian Model 3300 και ήταν εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη Megabore column 30x0.25mm και FID ανιχνευτή. Η αέρια χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο Fountoulaki et al [416].

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

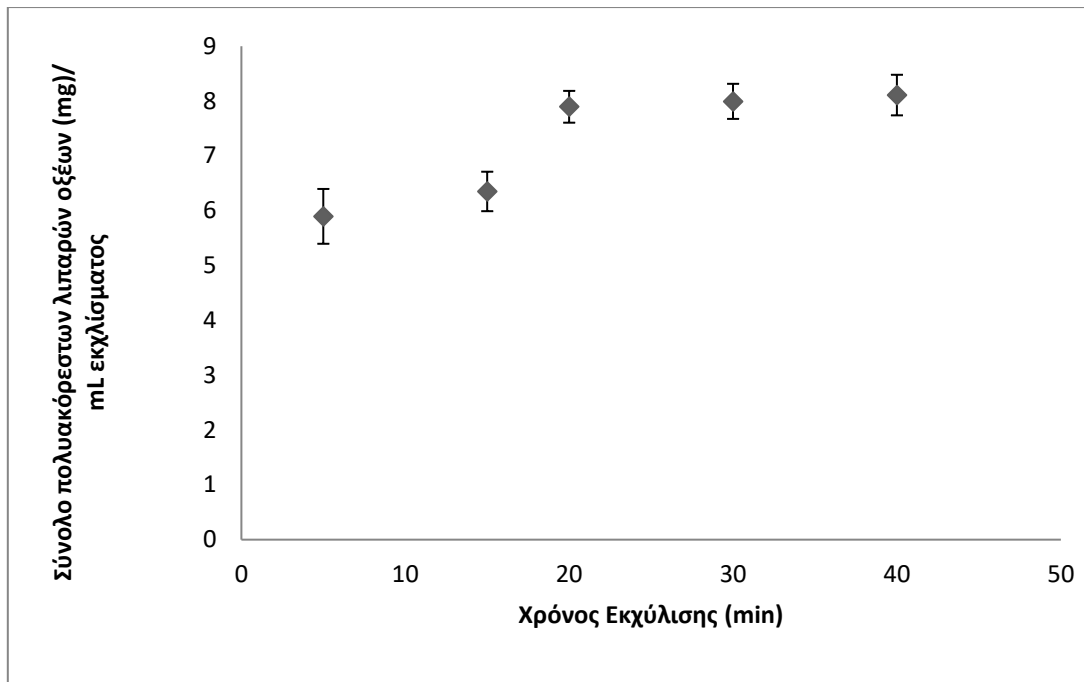
Η ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες και το κριτήριο ελέγχου του Tukey's HSD εφαρμόστηκαν ώστε να ανιχνευθούν οι διαφορές στην περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων στα εκχυλίσματα, λαμβάνοντας ως παραμετρικούς παράγοντες τις αναλογίες βιομάζας:διαλύτη αλλά και το είδος του διαλύτη εκχύλισης. Επιλέχθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$ και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0.05$.

6.4.1.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και ω -3 λιπαρών οξέων (εικοσαπενταενοϊκό οξύ, EPA) στο διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*

Όπως και στην περίπτωση του του φύκου *Haematococcus pluvialis*, η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* εξαρτάται ισχυρά από τη φύση του διαλύτη και την τεχνική εκχύλισης. Ως παράγοντες βελτιστοποίησης επιλέχθηκαν ο χρόνος, οι διαλύτες, η αναλογία βιομάζας:διαλύτη και η ένταση εκχύλισης με κριτήριο τη μέγιστη ανάκτηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Αρχικά, με σκοπό να βελτιστοποιηθεί ο χρόνος εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις παρουσία υπερήχων σε χρόνους εκχύλισης 5, 15, 20, 30 και 40min με σταθερή αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:10 και ένταση υπερήχων 100W. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 7.

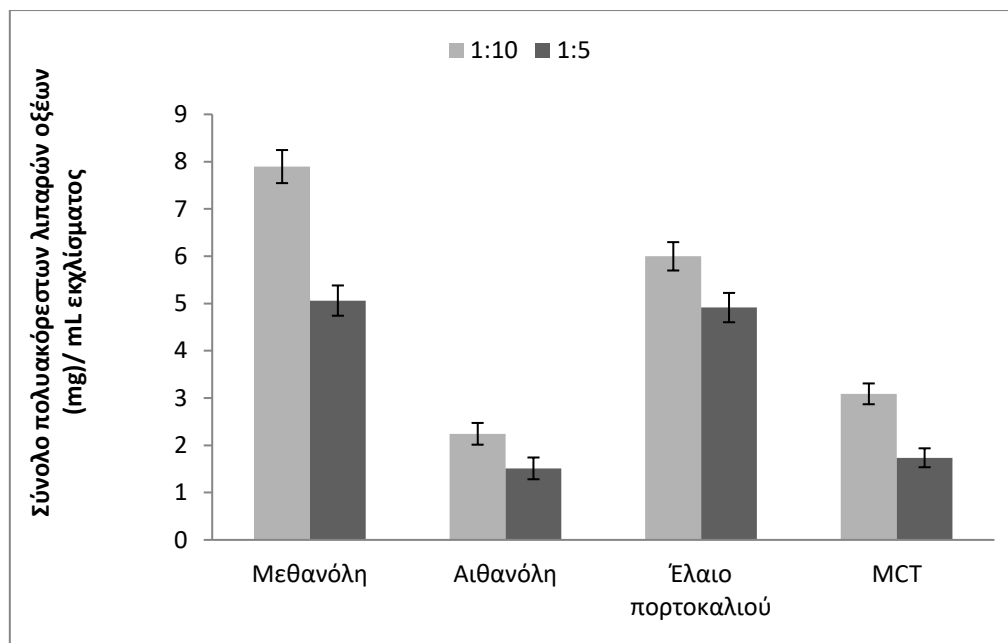


Διάγραμμα 7. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1mL εκχυλίσματος σε διάφορους χρόνους εκχύλισης παρουσία υπερήχων και σε αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:10 στα 100W.

Με βάση το Διάγραμμα 7, παρατηρείται ότι έως τα 20min η συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο εκχύλισμα αυξάνεται ενώ σε μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης η συγκέντρωση σταθεροποιείται. Επομένως, ως ιδανικός χρόνος εκχύλισης επιλέγονται τα 20min με βάση τα οποία θα πραγματοποιηθούν οι εκχυλίσεις που παρουσιάζονται παρακάτω.

Στη συνέχεια, λοιπόν, εξετάστηκαν διαφορετικές αναλογίες βιομάζας:διαλύτη και ειδικότερα 1:10 και 1:5 με χρήση τόσο φυσικών (έλαιο πορτοκαλιού, MCT) όσο και συμβατικών (μεθανόλη, αιθανόλη) διαλυτών. Οι δοκιμές αυτές έγιναν διατηρώντας σταθερή τόσο την ένταση των υπερήχων στα 100W όσο και τη διάρκεια εκχύλισης (20 min). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8 και παρατηρείται ότι αυξάνοντας την αναλογία βιομάζας:διαλύτη, η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνεται. Η ίδια τάση εμφανίζεται για όλους τους διαλύτες και το γεγονός αυτό οφείλεται στον γρήγορο κορεσμό των διαλυτών με τη χρήση υψηλών ποσοτήτων βιομάζας. Επομένως, η αναλογία βιομάζας / διαλύτη 1:10 κατά την εκχύλιση είναι πιο αποτελεσματική ως προς την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κατά τις δοκιμές που έγιναν με το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Επίσης, με βάση το Διάγραμμα 8, παρατηρείται ότι η μεθανόλη και το έλαιο

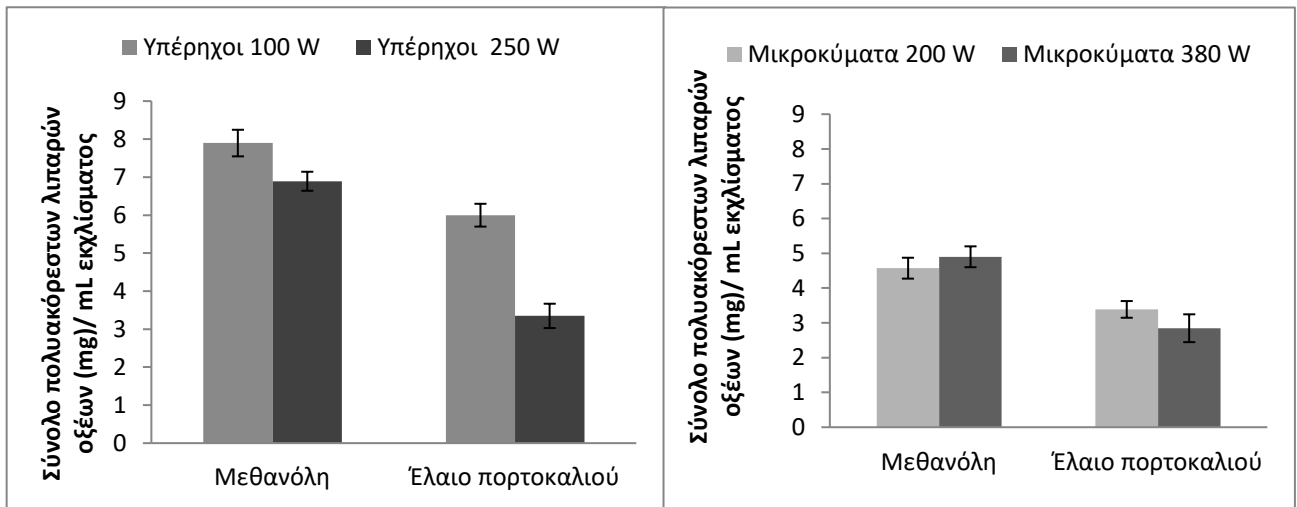
πορτοκαλιού παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ενώ ακολούθησαν το MCT και τέλος, η αιθανόλη.



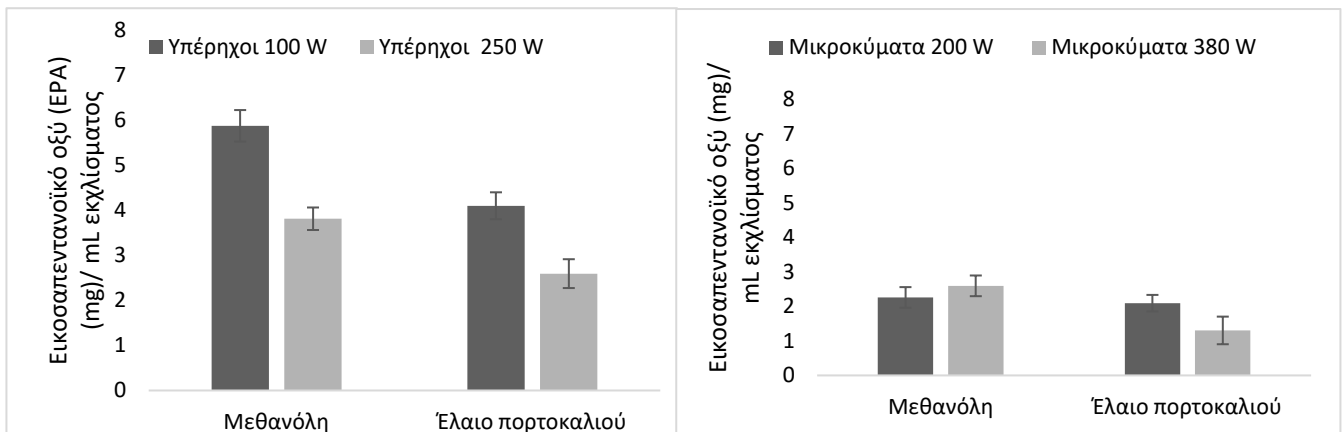
Διάγραμμα 8. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1mL εκχυλίσματος σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας:διαλύτη (1:10, 1:5), με ένταση υπερήχων 100W και χρήση μεθανόλης, αιθανόλης, ελαίου πορτοκαλιού και MCT ως διαλύτες.

Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω επιλέγεται ως ιδανική συνθήκη εκχύλισης εκείνη με την αναλογία βιομάζας / διαλύτη 1:10 όταν οι διαλύτες πρέπει να είναι η μεθανόλη και το έλαιο πορτοκαλιού που έχουν την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ανάμεσα σε αυτούς που δοκιμάστηκαν.

Όσον αφορά στις υποβοηθούμενες συνθήκες εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια δοκιμές παρουσία υπερήχων με ένταση 100, 250W αλλά και μικροκυμάτων με ένταση 200, 380W. Σκοπός είναι να επιλεγεί η ιδανική τεχνική υποβοήθησης της εκχύλισης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 9 και 10 αναφέρονται σε σταθερή αναλογία βιομάζας / διαλύτη 1:10 με χρήση μεθανόλης και ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτες.



Διάγραμμα 9. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς 1 mL εκχυλίσματος σε αναλογία βιομάζας :διαλύτη 1:10 παρουσία υπερήχων (αριστερά) και μικροκυμάτων (δεξιά) με χρήση μεθανόλης και ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτες.



Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA) ως προς 1 mL εκχυλίσματος σε αναλογία βιομάζας:διαλύτη 1:10 παρουσία υπερήχων (αριστερά) και μικροκυμάτων (δεξιά) με χρήση μεθανόλης και ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτες.

Με βάση τα Διαγράμματα 9 και 10, όσον αφορά τους διαλύτες εκχύλισης, η μεθανόλη είναι πιο αποτελεσματική από το έλαιο πορτοκαλιού για την ανάκτηση λιπαρών οξέων τόσο παρουσία υπερήχων όσο και μικροκυμάτων. Ωστόσο, το έλαιο πορτοκαλιού παρουσίασε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και μπορεί να αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική λύση για την ανάκτηση υψηλών ποσοστών σε λιπαρά οξέα έναντι της χρήσης συμβατικών διαλυτών όπως η μεθανόλη. Το εμπλουτισμένο έλαιο μπορεί τότε

να χρησιμοποιείται από την βιομηχανία χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς, χωρίς να αποτελεί εξωτερικό πρόσθετο αλλά συστατικό και τέλος, να υπόκεινται σε πολύ απλούς τεχνικούς περιορισμούς για την χρήση και εφαρμογή του – κυρίως οργανοληπτικής φύσης, στα περισσότερα αν όχι όλα τα προϊόντα εκτός των βρεφικών τροφών.

Επιπλέον, όσον αφορά την τεχνική εκχύλισης, αυτή με την παρουσία υπερήχων εμφάνισε υψηλότερη ανάκτηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συγκριτικά με την εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται ως έχουμε αναφέρει και σε προηγούμενο κεφάλαιο αλλά όπως βρίσκουμε και στην βιβλιογραφία στην μερική θερμική υποβάθμιση των λιπαρών οξέων λόγω παρουσίας μικροκυμάτων [417]. Τέλος, σχετικά με την εφαρμογή υπερήχων, παρατηρείται ότι αυξάνοντας την ένταση, η συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνεται στο εκχύλισμα. Συνεπώς, με βάση την παραπάνω παρατήρηση και την ολοκλήρωση των δοκιμών, ως βέλτιστη ένταση υπερήχων για την ανάκτηση των λιπαρών οξέων επιλέγονται τα 100W. Η ίδια τάση παρατηρείται και για το εικοσαπεντανοϊκό οξύ όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 10.

Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι από το σύνολο των δοκιμών, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτη, σε αναλογία εκχύλισης 1:10, σε χρόνο εκχύλισης 20 min παρουσίασαν καλύτερη απόδοση σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα εκείνα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία υπερήχων στα 100W.

Επιπλέον, για να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*. Με αυτό θέλουμε να δείξουμε ότι δεν υπάρχει μετάλλαξη, φθορά ή καταστροφή των λιπαρών οξέων με τη χρήση της νέας αυτής μεθόδου και ότι η σημαντικότητά της έγκειται κυρίως στον περιορισμό της χρήσης διαλυτών και του χρόνου εκχύλισης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 25 και 26 με βάση τα οποία συμπεραίνεται ότι το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* αποτελεί σημαντική πηγή ω-3 λιπαρών οξέων με κυριότερο το εικοσαπεντανοϊκό οξύ ενώ το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ DHA (22:6, ω3) ανιχνεύθηκε σε ίχνη.

Πίνακας 25. Προφίλ λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*

Λιπαρά οξέα	Rt (min)	mg/g ξηρής βιομάζας	Λιπαρά οξέα	Rt (min)	mg/g ξηρής βιομάζας
15:1	7.23	0,65	20:2 ω9 Eicosadienoic	20.82	2,85
16:0 Palmitic	8.92	21,08	20:4 ω3	22.39	3,00
16:1ω9	9.53	2,52	20:5 ω3 Eicosapentaenoic (EPA)	22.69	26,90
16:3 ω3	10.12	3,22	22:5 ω6	27.80	1,23
17:0 Margaric	11.02	11,57	22:6 ω3 (DHA)	28.41	0,80
18:0 Stearic	13.41	2,59	Σύνολο λιπαρών οξέων		76,46
18:2 ω6 Linoleic	15.44	1,80	Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων		42,35

Πίνακας 26. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*

Προφίλ πολυακόρεστων λιπαρών οξέων	mg/g ξηρής βιομάζας	% Συνόλου λιπαρών οξέων
ω3	33,93	44,38
Εκ των οποίων Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA)	26,90	35,19
Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	0,80	1,03
ω6	3,04	3,98
ω9	5,37	7,03
Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων	42,35	-

6.4.2 Υπερκρίσιμη εκχύλιση

6.4.2.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Το πρότυπο δεκαεπτανικό οξύ C17:0 το προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής ποιότητας. Η ξηρή βιομάζα από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* παραχωρήθηκε από την εταιρεία Algatechnologies Ltd (Israel).

Μέθοδοι

Υπερκρίσιμη εκχύλιση

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε ειδική διάταξη (υπερκρίσιμης εκχύλισης) η οποία βρίσκεται στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Algatechnologies Ltd

(Israel) όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 2. Ζυγίστηκαν 1,3 kg του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* και τοποθετήθηκαν στο δοχείο εκχύλισης χωρητικότητας 5L. Η εκχύλιση διεξήχθη για περίπου 5 και 7 h και σε πίεση 800 και 600 bar, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν σταθερή και ίση με 60°C. Ακολούθως, το εκχυλιζόμενο ρεύμα από την συσκευή αποσυμπιέστηκε μέσω δύο μειωτήρων (ρυθμιστών) πίεσης και το εκχύλισμα συλλέχθηκε από τους δύο διαχωριστές σε διάστημα 5 έως 7 h σε σκουρόχρωμους δοκιμαστικούς σωλήνες για την πρόληψη της φωτοαποδόμησης. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ανάκτησης των λιπαρών οξέων ήταν η πίεση και ο χρόνος εκχύλισης όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27. Παράμετροι σχεδιασμού υπερκρίσιμης εκχύλισης

Παράμετροι Λειτουργίας	Πίεση εκχύλισης (bar)	Χρόνος εκχύλισης (h)
Πειραματικός σχεδιασμός	800	5
	600	7

Απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης

Η απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης ορίζεται ως kg προϊόντος/ kg βιομάζας.

Μετεστεροποίηση λιπαρών οξέων

Αρχικά, λαμβάνονται 0.65g εκχυλίσματος τα οποία διαλύονται σε 13mL μεθανόλης: ακετογλωρίδιου (95:5) στους 0°C. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο Teflon σε ατμόσφαιρα αζώτου και θερμαίνεται στους 80 °C για 1h. Έπειτα, το διάλυμα αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώνεται με 5mL νερού και 5mL εξάνιου που περιέχουν 0.01% βουτυλιωμένη υδροξυτολουόλη. Απομονώνεται η φάση του εξάνιου, στην οποία έχουν προσροφηθεί τα λιπαρά οξέα, απομακρύνεται η υγρασία με χρήση άλατος Na₂SO₄ και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε εξάνιο.

Αέρια χρωματογραφία προσδιορισμού λιπαρών οξέων

Η αέρια χρωματογραφική ανάλυση διεξήχθη σε μια συσκευή GC-MS τύπου Hewlett Packard HP 5890 Series GC με τριχοειδή στήλη τύπου DB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm) σε θερμοκρασία 195⁰C. Η θερμοκρασία του εγχυτήρα και του ανιχνευτή ιονισμού

φλόγας ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία 230⁰C και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε H₂ (3 mL/min). Για την ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε δεκαεπτανικό οξύ C17:0 ως εσωτερικό πρότυπο. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων ταυτοποιήθηκαν μέσω αέριας χρωματογραφίας με χρήση προτύπων και με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC-MS). Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας ως πακέτο λογισμικού GC-MS το ChemStation software.

Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες και το κριτήριο ελέγχου του Tukey's HSD εφαρμόστηκαν ώστε να ανιχνευθούν οι διαφορές περιεκτικότητας στα λιπαρά οξέα των εκχυλισμάτων, θεωρώντας ως παράγοντες την πίεση και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Επιλέχθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0,05$.

6.4.2.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Υπερκρίσιμη εκχύλιση με σκοπό την ανάκτηση ωφέλιμων λιπαρών οξέων

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζεται η απόδοση της υπερκρίσιμης εκχύλισης (kg εκχυλίσματος/ kg ξηρής βιομάζας) από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* συναρτήσει της πίεσης λειτουργίας και του χρόνου εκχύλισης.

Πίνακας 28. Απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης συναρτήσει της πίεσης λειτουργίας και του χρόνου εκχύλισης

Πίεση λειτουργίας (bar)	Χρόνος Εκχύλισης (h)	Απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης (g Εκχυλίσματος/g Dry Biomass)
800	5	12.90
600	7	13.30

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 27 παρατηρείται ότι η απόδοση υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι λίγο υψηλότερη όταν η πίεση λειτουργίας είναι 600bar και ο χρόνος εκχύλισης 7h, ενώ και σε πίεση λειτουργίας 800bar επιτυγχάνεται ικανοποιητική απόδοση σε συντομότερο χρόνο εκχύλισης (5h). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα αυξάνεται με την αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται και η ανάκτηση του εκχυλίσματος. Ωστόσο, για να μπορέσουμε να καταλήξουμε στις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης πρέπει να εξεταστεί το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε λιπαρά οξέα και ειδικότερα σε εικοσαπενταενοϊκό οξύ.

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζεται η σύσταση των λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* ως συνάρτηση των συνθηκών εκχύλισης (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το κύριο λιπαρό οξύ το οποίο ανακτάται από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* είναι το EPA, η σύσταση του οποίου φτάνει έως και 32.8% επί του συνόλου των λιπαρών οξέων. Άλλα κύρια λιπαρά οξέα που παρουσιάζονται στο εκχύλισμα είναι το C16:0, C16:1n-7 και C18:3n-3 (ALA).

Όσον αφορά της συνθήκες εκχύλισης, η σύσταση των λιπαρών οξέων ακολουθεί την ίδια τάση με την απόδοση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ως πίεση λειτουργίας 600 bar και χρόνο εκχύλισης 7 h επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ανάκτηση εικοσαπεντανοϊκού οξέος. Ωστόσο, οι διαφορές στην σύσταση των εκχυλισμάτων σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ ανάμεσα στις δυο συνθήκες εκχύλισης δεν είναι σημαντικές ($p < 0.05$) για τις διάφορες συνθήκες εκχύλισης. Επομένως, επιλέγονται ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης η πίεση λειτουργίας 800bar και ο χρόνος εκχύλισης 5h καθώς το εικοσαπεντανοϊκό οξύ ανακτάται σε συντομότερο χρόνο εκχύλισης.

Πίνακας 29. Σύσταση λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* ως συνάρτηση των συνθηκών εκχύλισης (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων)

Λιπαρά οξέα	Συνθήκες Υπερκρίσιμης Εκχύλισης	
	800bar, 5h	600bar, 7h
C4:0 Butyric Acid	<0.1	<0.1
C6:0 Caproic acid	<0.1	<0.1
C8:0 Caprylic acid	<0.1	<0.1
C10:0 Capric acid	<0.1	<0.1
C10:1 Decenic acid+isomeres	<0.1	<0.1
C12:0 Lauric acid	<0.1	<0.1
C14:0 Myristic acid	8.7	8.6
C14:1 Myristoleic acid+isomeres	<0.1	<0.1
C15:0 Pentadecanic acid	0.4	0.4
C15:1 Pentadecenoic acid+isomeres	<0.1	<0.1
C16:0 Palmitic acid	11.8	11.3
C16:1 Palmitoleic acid+isomeres	25.0	24.6

C17:0 Margaric acid	<0.1	<0.1
C17:1 Heptadecenoic acid+isomeres	0.1	0.1
C18:0 Stearic acid	0.3	0.3
C18:1 trans Elaidic acid	7.9	8.2
C18:1-11 cis Vaccenic acid	0.6	0.5
C18:1-13 13-oleic acid	<0.1	<0.1
C18:1-19 Oleic acid	2.4	2.0
C18:2cis/trans	<0.1	<0.1
C18:2 Linoleic acid	4.1	3.9
C18:2 trans/cis	<0.1	<0.1
C18:2 trans/trans	0.3	0.2
C18:3 Alpha Linolenic acid	0.8	0.6
C18:3 cis/cis/trans	<0.1	<0.1
C18:3 cis/trans/cis	<0.1	<0.1
C18:3 gamma-linolenic acid	0.5	0.5
C18:3 trans/cis/cis	<0.1	<0.1
C18:3 trans/cis/trans	<0.1	<0.1
C18:4 Octadecatetraenic acid	0.4	0.4
C20:0 Arachidic acid	<0.1	<0.1
C20:1 Eicosenoic acid+isomers	<0.1	<0.1
C20:2 Eicosodienoic acid+isomeres	<0.1	<0.1
C20:3 Eicosatrienoic acid	<0.1	<0.1
C20:4 Arachidonic Acid	3.8	3.9
C20:5 Eicosapentaenic acid	31.5	32.8
C22:0 Behenic acid	<0.1	<0.1
C22:1 Docosenic acid+isomers	<0.1	<0.1
C22:2 Docosadienoic acid+isomeres	<0.1	<0.1
C22:5 Docosapentaenic acid	<0.1	<0.1
C22:6 Docosahexaenic acid	0.4	0.4

C23:0 Tricosanoic acid	<0.1	<0.1
C24:0 Lignoceric acid	0.3	0.3
C24:1 Tetracosenoic acid+isomeres	0.1	0.1
Σύνολο Πολυακόρεστων	41.7	42.8
Σύνολο Λιπαρών Οξέων	8.4	8.6

6.5 Εκχύλιση με μικρογαλακτώματα

Προκαταρκτικά πειράματα εκχύλισης με μικρογαλακτώματα που πραγματοποιήθηκαν για το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό η μέθοδος αυτή δεν επιλέχθηκε για το συγκεκριμένο φύκος και την εκχύλιση των λιπαρών οξέων.

6.6 Η Ξήρανση: Προεπεξεργασία για την Εκχύλιση

6.6.1 Ξήρανση Βιόμαζα Μικροφυκών: Σκοπός και Τεχνικές

Τα μικροφύκη έχουν τραβήξει την προσοχή πολλών ερευνητών τα τελευταία χρόνια όχι μόνο ως δυνητικοί παραγωγή συστατικών τροφίμων και φαρμάκων αλλά και ως μια αξιόπιστη και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας [419]. Έχουν πολλές φορές αναφερθεί ως βιοκαύσιμο τρίτης γενιάς και μπορούν να αποδώσουν έως και 30 φορές περισσότερη ενέργεια ανά μονάδα έκτασης σε σύγκριση με τα βιοκαύσιμα πρώτης και δεύτερης γενιάς [420]. Επιπλέον, έχουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, ικανότητα απορρόφησης άνθρακα και αυξημένη παραγωγή λιπιδίων σε σύγκριση με τα χερσαία φυτά. Τα κύρια συστατικά ενδιαφέροντος που συλλέγονται από μικροφύκη περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και μικρές συγκεντρώσεις βιταμινών, χρωστικών ουσιών και στερολών.

Τα μικροφύκη μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλη κλίμακα σε φωτοβιοαντιδραστήρες ή λίμνες διαδρόμων [421]. Η καλλιέργεια του στελέχους ενδιαφέροντος ακολουθείται από τη συγκομιδή της τελικής βιομάζας μέσω μιας σειράς σταδίων, συμπεριλαμβανομένου του διαχωρισμού της βιομάζας, της διαλογής, της πάχυνσης, της αφυδάτωσης και της ξήρανσης και, τέλος, της ορθής εκχύλισης των προϊόντων που μας ενδιαφέρουν. Είναι ζωτικής σημασίας να βελτιστοποιηθούν αυτά

τα βήματα για την αποτελεσματική παραγωγή βιομάζας φυκιών υψηλής ποιότητας. Η αφυδάτωση και η ξήρανση αποτελούν ζωτικά στοιχεία της επακόλουθης εκχύλισης.

Έχει μάλιστα αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις ότι η βιομάζα των μικροφυκών είναι ευαίσθητη και ο χρόνος που μεσολαβεί από την αλίευσή τους μέχρι την εκχύλιση των ζητούμενων βιοδραστικών ουσιών είναι αρκετός και ικανός να προκαλέσει την υποβάθμιση τους. Για το σκοπό αυτό η ξήρανση επιβάλλεται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδο τόσο για διατηρήσει αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά της βιομάζας όσο και για να επιτρέψει την ορθή και βιώσιμη εμπορική διαχείριση και την παραγωγή βιομηχανικών πλέον σταθερών ποιοτικών προϊόντων. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την αφυδάτωση αρχικά και την ξήρανση κατόπιν της βιομάζας των μικροφυκών [418].

Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να εξεταστούν οι διαφορετικές τεχνικές και οι επιπτώσεις τους στο κόστος και την ενέργεια και κυρίως στην ποιότητα της βιομάζας, των προϊόντων υψηλής αξίας και των μεταβολιτών. Πρωτίστως, η αφυδάτωση των μικροφυκών εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα της μετέπειτα επεξεργασίας, αφαιρώντας το μεγαλύτερο μέρος του νερού, γεγονός που μειώνει το κόστος και την ενέργεια που απαιτείται για τα ακόλουθα στάδια ξήρανσης. Η αφυδάτωση απαιτεί περίπου το 20-40% των ενεργειακών απαιτήσεων ολόκληρης της διαδικασίας συλλογής μικροφυκών. Επιπλέον, οι κίνδυνοι μόλυνσης πρέπει να εξαλειφθούν στην περίπτωση παραγωγής για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τα ζώα [422].

Η διαδικασία ξήρανσης που ακολουθεί είναι εξίσου σημαντική με την αφυδάτωση των μικροφυκών. Θεωρείται ένα κρίσιμο βήμα, τόσο για βιοκαύσιμα όσο και βιοπροϊόντα [423]. Η υδαρής βιομάζα των φυκών που ανακτάται από τις διαδικασίες συγκομιδής μπορεί να είναι, ως είπαμε, ευπαθής και πρέπει άμεσα και γρήγορα να σταθεροποιηθεί. Η ξήρανση είναι η καλύτερη μέθοδος για την σταθεροποίηση. Σύμφωνα με τους Patil et al., η διαδικασία ξήρανσης απαιτεί την περισσότερη ενέργεια, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 80% του συνολικού κόστους παραγωγής προϊόντων με βάση τα μικροφύκη ακόμη και για βιοντήζελ [424, 348].

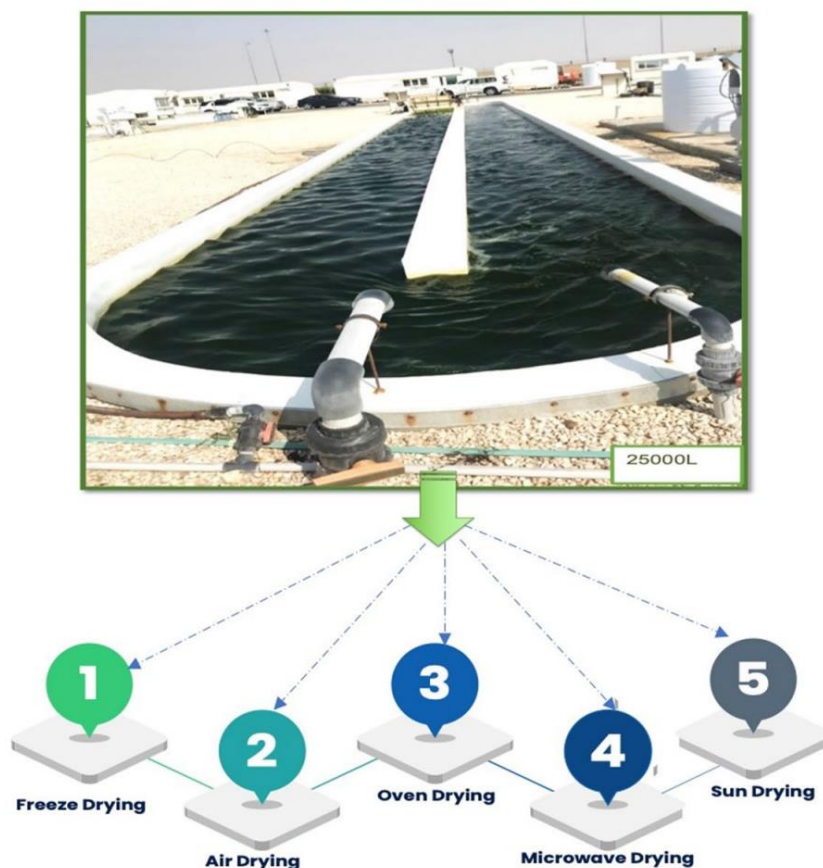
Καθώς, ως αναφέραμε, η βιομάζα των μικροάλγων είναι ευαίσθητη σε μικροβιακή μόλυνση, μηχανικές βλάβες και αντίξοες συνθήκες αποθήκευσης, οι οποίες μπορεί να υποβαθμίσουν την ποιότητα της είναι εξαιρετικά σημαντικό να ξηραίνεται αποτελεσματικά για την άμεση σταθεροποίηση και καλύτερη αποθήκευση. Οι τρόποι

ξήρανσης μικροφυκών που εφαρμόζονται είναι η συμβατική ξήρανση στον ήλιο, η ξήρανση με ζεστό αέρα, η λυοφιλίωση, η ξήρανση μικροκυμάτων, η ξήρανση σε φούρνο και η ξήρανση με ψεκασμό [425, 426].

Συνήθως ακολουθούνται οι συμβατικές μέθοδοι όπως η ξήρανση στον ήλιο και η ξήρανση σε φούρνο, καθώς αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν υψηλή ενέργεια και εισροή κεφαλαίου. Αλλά αυτές έχουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως η ευαισθησία σε μόλυνση από εξωτερικές πηγές όπως τα πουλιά και τα έντομα αλλά και οι μικροοργανισμοί στην περίπτωση της ξήρανσης στον ήλιο. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στις καιρικές συνθήκες και μπορεί να μην είναι εφικτή για περιοχές με υψηλές βροχές και χαμηλή ηλιοφάνεια. Ένας άλλος λόγος είναι η αποικοδόμηση χρωστικών ουσιών όπως η χλωροφύλλη λόγω της άμεσης ηλιακής ακτινοβολίας [427]. Επιπλέον, η ξήρανση σε φούρνο μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τους θερμικά ασταθείς μεταβολίτες και τις βιοδραστικές ενώσεις λόγω της άμεσης έντονης θέρμανσης κυρίως στην επιφάνεια του προϊόντος.

Από την άλλη, διαδικασίες ξήρανσης όπως η λυοφιλοποίηση και η ξήρανση με ψύξη με ψεκασμό εφαρμόζονται πλέον συχνότερα για την ξήρανση της βιομάζας των μικροφυκών. Η λυοφιλίωση μπορεί να είναι μία από τις ασφαλέστερες μορφές ξήρανσης όσον αφορά τη διατήρηση σημαντικών υποπροϊόντων που ενδέχεται να χαθούν διαφορετικά, ενώ η διαδικασία ξήρανσης με ψεκασμό μπορεί να είναι πιο χρονοβόρα και λόγω κόστους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας.

Τα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος επένδυσης και λειτουργίας αλλά και η πιο σύνθετη και απαιτητική συντήρηση. Επιπλέον, η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό περιλαμβάνει μηχανισμούς υψηλής μηχανικής πίεσης, οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν μηχανικά τα κύτταρα και να αποικοδομήσουν συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως χρωστικές ουσίες [428]. Τέλος, η επιλογή της ξήρανσης εξαρτάται από το διαθέσιμο κεφάλαιο και τις πηγές ενέργειας και από τη σημασία των υποπροϊόντων που πρέπει να επιτευχθούν επιτυχώς από τη συγκομιδή φυκών.



Σχήμα 10. Μέθοδοι ξήρανσης βιομάζας μικροφυκών

Παρόλο που οι διαδοχικές διαδικασίες, όπως η αφυδάτωση και η ξήρανση, μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την εκχύλιση πολύτιμων υψηλής ποιότητας βιοκαυσίμων μικροφυκών και πρώτων υλών για συμπληρώματα διατροφής ή ζωοτροφές, υπάρχει περιορισμένη έρευνα που να περιγράφει τη σημασία τους.


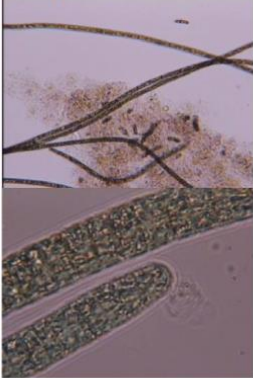
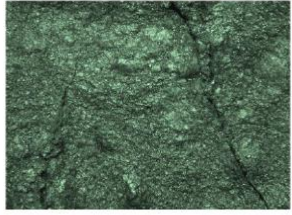

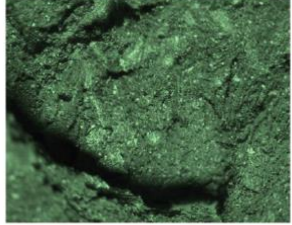



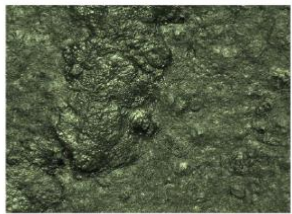
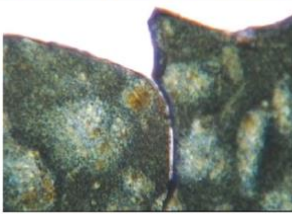
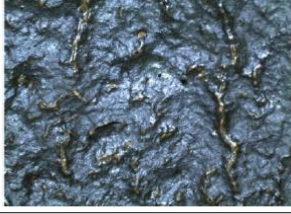
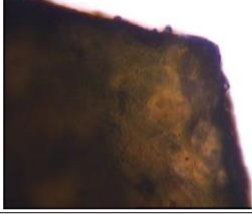
Στα πλαίσια της ανάγκης δημιουργίας πρότυπων διαλυμάτων για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων μελετήσαμε αρχικά βιβλιογραφικά και κατόπιν πειραματικά τις διάφορες τεχνικές εφαρμόζοντάς τις για την ξήρανση της *Spirulina Plantensis* που είναι και η πλέον διαδεδομένη και χρησιμοποιείται ήδη στη βιομηχανία χυμών [426]. Στο παραπάνω Σχήμα 10 φαίνονται συνοπτικά οι διάφορες μέθοδοι που εφαρμόζονται ευρέως στη βιομηχανία.

Αντίστοιχη μελέτη έχει γίνει και από άλλη ομάδα για το μικροφύκος *Tetraselmis subcordiformis* με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών τεχνικών ξήρανσης στη διατροφική ποιότητα της βιομάζας μικροφυκών [423]. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη, πρωτεΐνες,

λιπίδια και FAME για την επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής ξήρανσης που οδηγεί στη διατήρηση βιομάζας υψηλής ποιότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τελικά για την παραγωγή ζωοτροφών. Θεωρείτε επίσης, ότι εκ του αποτελέσματος της μεθόδου, θα ενισχυθεί η βιωσιμότητα της μεγάλης κλίμακας παραγωγής βιομάζας υπό ξηρό κλίμα.

Στην περίπτωση της *Spirulina Plantensis* έγινε αξιολόγηση τόσο των επιδόσεων και της αποτελεσματικότητας της κάθε μεθοδολογίας όσο και συγκριτική ανάλυση που αφορούσε στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος της κάθε διαδικασίας. Ελέγχθηκε η τελική υγρασία και οι κινητικές της κάθε τεχνικής με οπτική και στερεοσκοπική ανάλυση.

Η *Spirulina* έχει προσελκύσει ιδιαίτερο βιομηχανικό ενδιαφέρον λόγω της σημασίας της ως ανθρώπινης τροφής και των μοναδικών διατροφικών ιδιοτήτων της [429]. Ανήκει σε είδη κυανοβακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται σε αλκαλικό νερό υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι. Μεταξύ των διαφόρων ειδών *Spirulina* τα πιο εντατικά μελετημένα είναι τα *Spirulina platensis* (SP), *Spirulina maxima* και *Spirulina fusiformis*. Το SP είναι ευρέως γνωστό και έχει πολλές θρεπτικές και θεραπευτικές εφαρμογές χάρη στον πλούτο του σε θρεπτικά συστατικά και βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, κυρίως φυκοκυανίνες, καροτενοειδή, χλωροφύλλες και φαινολικά οξέα και είναι ιδιαίτερα αξιοποιημένη εμπορικά ενώ συνεχώς προστίθενται νέες εφαρμογές των προϊόντων της καθώς εξελίσσονται και οι μέθοδοι καλλιέργειας και εκμετάλλευσης [429, 430, 442, 443].

	Stereoscopic microscopy	Optical microscopy
a		
b		
c		
d		
e		
f		

Εικόνα 16. Παρατηρήσεις στερεοσκοπικής και οπτικής μικροσκοπίας σε μη επεξεργασμένη (a), ατμοσφαιρικά αποξηραμένη (b), λυοφιλιωμένη (c), αποξηραμένη υπό κενό στους 30°C (d), αποξηραμένη υπό κενό στους 50°C (e) και επιταχυνόμενη ηλιακά αποξηραμένη (f) Βιομάζα *Spirulina platensis* (SP)

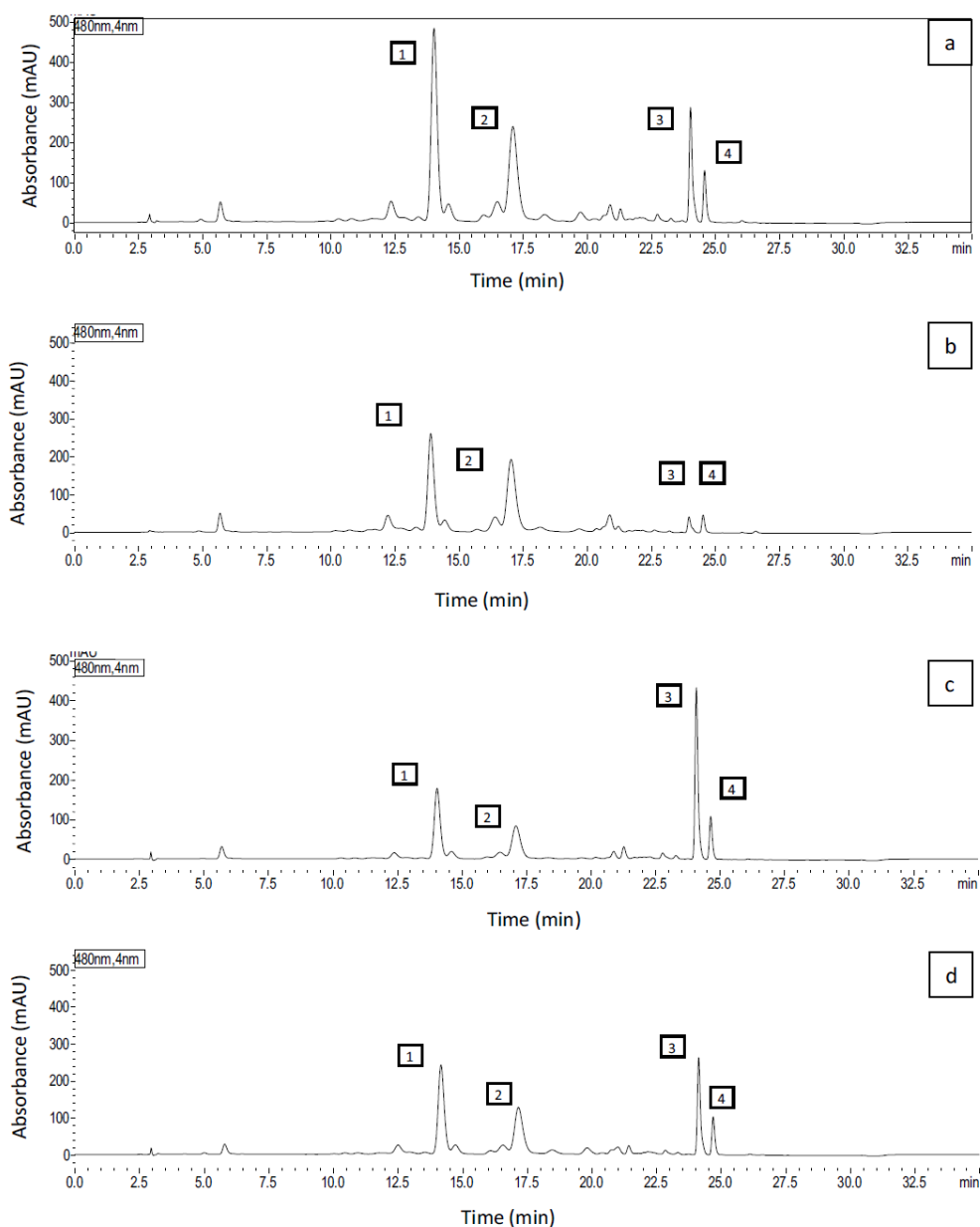
Για την συγκριτική ανάλυση των μεθόδων ξήρανσης θα χρησιμοποιηθούν ουσίες που αναλύονται παρακάτω. Η φυκοκυανίνη είναι μια φωτοσυνθετική χρωστική ουσία της οικογένειας των φυκολιπρωτεϊνών. Οι φυκολιπρωτεΐνες συμμετέχουν σε μια εξαιρετικά αποτελεσματική αλυσίδα μεταφοράς ενέργειας στη φωτοσύνθεση, υπεύθυνες για περίπου το 50% του απορροφούμενου φωτός από κυανοβακτήρια και παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες [431]. Το πρωτεϊνικό κλάσμα του SP μπορεί να περιέχει έως και 20% φυκοκυανίνη επί ξηρού βάρους [432].

Επιπλέον, η *Spirulina* είναι πλούσια πηγή καροτενοειδών, τα οποία αποτελούν τις σημαντικότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες σε συνδυασμό με την προστασία της χλωροφύλλης και της θυλακοειδούς μεμβράνης από φωτοοξειδωτική βλάβη. Από τη μεγάλη δεξαμενή καροτενοειδών, το β-καροτένιο κατέχει προεξέχουσα θέση, συμβάλλοντας στην προστασία από χρόνιες ασθένειες [433].

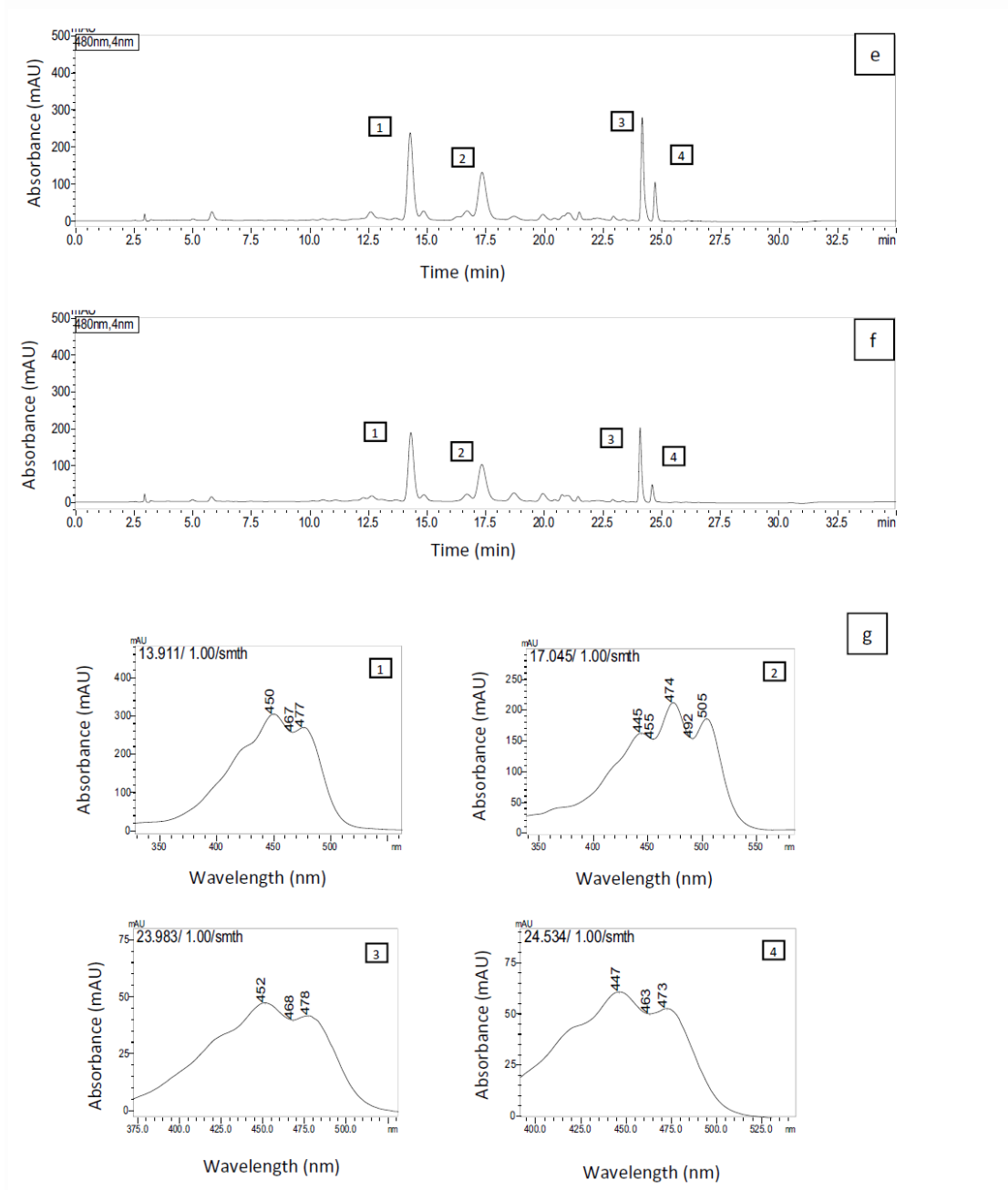
Ακόμη, η *Spirulina platensis* παρουσιάζει μία από τις υψηλότερες περιεκτικότητες χλωροφύλλης-α που βρίσκονται στη φύση, που αντιστοιχεί στο 1,15% της βιομάζας της [434]. Η χρήση του φύκου *Spirulina platensis* για την παραγωγή χλωροφύλλης θεωρείται μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στα βιομηχανικά παρασκευασμένα παράγωγα χλωροφύλλης, που προορίζονται για τη διατροφή, καθώς και για την αγορά καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων [435]. Τέλος, οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στη *Spirulina* είναι ένας πιθανό να συνεισφέρουν στην καταπολέμηση των ελεύθερων ριζών, οι οποίες είναι επιβλαβείς για το ανθρώπινο σώμα και τα συστήματα τροφίμων [436].

Το μικροφύκος *Spirulina platensis* είναι ιδανικό για την παραγωγή βιομάζας φυκών καθώς έχει σχετικά υψηλό ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης με εύκολο έλεγχο της διαδικασίας και γρήγορη ανάκτηση βιομάζας λόγω της νηματοειδούς κυτταρικής δομής του [437]. Μετά τη συγκομιδή, η βιομάζα έχει κατά προσέγγιση περιεκτικότητα σε υγρασία 90 g (στα 100 g υγρού δείγματος). Το γεγονός αυτό καθιστά αναπόφευκτη την επεξεργασία ξήρανσης αμέσως μετά τη διαδικασία συγκομιδής [438]. Μελετήθηκε η ξήρανση του *Spirulina platensis* και αξιολογήθηκε ως προς τη μείωση της περιεκτικότητας σε υγρασία, την αλλαγή της δομής, τη φθορά του χρώματος, την περιεκτικότητα σε χρωστικές ουσίες και την αντιοξειδωτική δράση από όπου και τα παρακάτω δεδομένα [426].

Σκοπός αυτής της ανάλυσης είναι η σύγκριση της βιοδραστικής περιεκτικότητας και της αντιοξειδωτικής δράσης της ακατέργαστης *Spirulina platensis* με τη βιομάζα που έχει αποξηρανθεί με τέσσερις διαφορετικές τεχνικές ξήρανσης: λυοφιλίωση, ξήρανση υπό κενό, ατμοσφαιρική ξήρανση και επιταχυνόμενη ηλιακή ξήρανση. Η αξιολόγηση του βιοδραστικού περιεχομένου βασίστηκε σε φασματοφωτομετρικές (UV-Vis) και χρωματογραφικές αναλύσεις (HPLC) για τον προσδιορισμό ολικών καροτενοειδών, β-καροτίνης, χλωροφύλλης και φαινολικών ενώσεων. Δείγματα ακατέργαστης και αποξηραμένης βιομάζας αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζυλίου (DPPH). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC παρουσιάζουμε στο γραφήμα της Εικόνας 5.



α



Εικόνα 17. Υγρά χρωματογραφήματα υψηλής πίεσης (HPLC) α) υγρής, β) αποξηραμένης με ατμοσφαιρική πίεση, γ) λυοφιλιωμένης, δ) ξήρανσης υπό κενό στους 30°C, ε) ξήρανσης υπό κενό στους 50°C και ς) αποξηραμένης στον ήλιο βιομάζας *Spirulina platensis* (SP). Ανίχνευση: 480 nm. Στήλη 30 μm, Διαλύτες: μεθανόλη, τ-βουτυλομεθυλαιθέρας και υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 1%. Ρυθμός ροής: 1 mL/min. Ταυτότητες κορυφής: 1: ζεαξανθίνη, 2: ξανθοφίλη, 3: β-καροτένιο, 4: κρυπτοξανθίνη. γ) φάσματα HPLC-UV-DAD των χρωματογραφικών κορυφών για τη βιομάζα SP (οι αριθμοί αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κορυφών του σχήματος 3 α-δ, ς).

Αντίστοιχα αποτελέσματα της συγκέντρωσης καροτενοειδών και φυκοκυανινών παρουσιάζονται στους Πίνακες 30 και 31.

Πίνακας 30. Φασματοσκοπικές ιδιότητες, συγκέντρωση των σημαντικότερων καροτενοειδών (εκφραζόμενα σε mg /g ξηρών στερεών) σε αιθανολικά εκχυλίσματα *Spirulina Platensis* (SP), υγρής, ατμοσφαιρικά αποξηραμένης, λυοφιλωμένης, ξηρανθείσας υπό κενό στους 30°C, ξηρανθείσας υπό κενό στους 50°C και επιταχυνόμενα ηλιακά αποξηραμένης βιομάζας. Τα δεδομένα ελήφθησαν από το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Ανίχνευση: 480 nm. Στήλη 30 μm, Διαλύτες: μεθανόλη, t-βουτυλομεθυλαιθέρας και υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 1%. Ρυθμός ροής: 1 mL/min

Peak Number	Identified carotenoid	Retention Time (min)	λmax (nm)	III/II (%)	C (mg (g dry solids) ⁻¹)					
					Wet	Atmospheric dried	Freeze dried	Vacuum dried (30 oC)	Vacuum dried (50 oC)	Accelerated Solar dried
1	Zeaxanthin	14.04	450, 477, 448, 474, 505	26.46	0.32 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.01 ^{b,c}	0.15 ± 0.00 ^d	0.25 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.00 ^c	0.16 ± 0.00 ^d
2	Myxoxanthophyll	17.10		54.89	0.23 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.00 ^c	0.15 ± 0.00 ^d	0.14 ± 0.00 ^{d,e}	0.12 ± 0.01 ^{c,e}
3	β-carotene	24.01	452, 478	25.29	0.13 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^d
4	Cryptoxanthin	24.65	447, 473	23.48	0.06 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.00 ^c	0.05 ± 0.00 ^c	0.04 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^b
Total Carotenoids					0.74 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.01 ^b	0.49 ± 0.01 ^b	0.58 ± 0.01 ^c	0.51 ± 0.01 ^{b,c}	0.36 ± 0.01 ^b

*Αριθμός επαναλήψεων (N) = 2, ± δείχνει την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. Οι τιμές που δεν μοιράζονται τον ίδιο εκθέτη (ξεχωριστά για κάθε ταυτοποιημένο καροτενοειδές και ολικό καροτενοειδές) διαφέρουν σημαντικά (p < 0,05)

Πίνακας 31. Συγκέντρωση φυκοκυανίνης (εκφραζόμενη σε εκατοστιαία αναλογία επί ξηρού), ολικής φαινολικής περιεκτικότητας [εκφραζόμενης σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE)/(g ξηρών στερεών)] και αντιοξειδωτικής δράσης (εκφραζόμενης σε εκατοστιαία αναλογία επί ξηρού) στη *Spirulina platensis*, υγρή, ατμοσφαιρικά αποξηραμένη, λυοφιλοποιημένη, αποξηραμένη υπό κενό στους 30°C, αποξηραμένη υπό κενό στους 50°C και επιταχυνόμενη ηλιακά αποξηραμένη βιομάζα.

	Wet	Atmospheric dried	Freeze dried	Vacuum dried (30°C)	Vacuum dried (50°C)	Accelerated Solar dried
Phycocyanin content (%dry weight)	10.57 ± 0.28 ^a	9.65 ± 0.19 ^b	9.02 ± 0.11 ^c	8.13 ± 0.23 ^d	4.80 ± 0.14 ^e	3.32 ± 0.10 ^e
Total phenolic content (mg GAE (g dry solids) ⁻¹)	81.18 ± 2.13 ^a	58.78 ± 1.21 ^b	54.42 ± 0.68 ^c	46.46 ± 1.33 ^c	45.86 ± 1.32 ^c	47.38 ± 1.33 ^c
Antioxidant activity (% dry weight)	32.86 ± 0.48 ^a	16.55 ± 0.34 ^b	16.36 ± 0.20 ^c	20.20 ± 0.58 ^d	29.10 ± 0.84 ^e	31.28 ± 0.90 ^e

*Αριθμός επαναλήψεων (N) = 3, ± δείχνει την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. Οι τιμές που δεν μοιράζονται τον ίδιο εκθέτη (ξεχωριστά για την περιεκτικότητα σε φυκοκυανίνες, τη συνολική φαινολική περιεκτικότητα και την αντιοξειδωτική δράση) διαφέρουν σημαντικά (p < 0,05).

Στη συνέχεια αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά στοιχεία και για ξήρανση με ψεκασμό ιδιαίτερα για άμεση εφαρμογή σε τρόφιμα. Παρουσιάζονται αρκετές μελέτες για άμεση χρήση των προϊόντων αποξηραμένης βιομάζας μικροφυκών σε τρόφιμα όπως παγωτά και γλυκά [439, 440]. Η αποξηραμένη βιομάζα χρησιμοποιήθηκε ως χρωστικό μέσο στην παραγωγή παγωτών. Μάλιστα ο Zhang et al (2022) έχει κάνει μια ανάλυση στις βιβλιογραφικές μελέτες για την επίδραση της ξήρανσης με ψεκασμό στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προϊόντων των μικροφυκών. Αυτές καθώς και οι συνθήκες ξήρανσης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 32.

Πίνακας 32. Μελέτες για την ξήρανση βιομάζας μικροφυκών με τεχνολογία ξήρανσης με ψεκασμό [440]

Microalgae	Drying conditions	Biomass/biochemical composition	Main results
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Ti: 170 °C	Omega-3 and fatty acid composition	Spray drying had little effect on the omega-3 lipids
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Ti: 140–150 °C	Moisture content, ash, protein, chlorophyll, total coliforms and bacteria, and color	Spray-dried biomass had higher chlorophyll content and fewer bacteria than freeze-dried biomass
<i>Isochrysis galbana</i> and <i>Nannochloropsis oculata</i>	Ti: 170 °C Ti: 180 °C	Drying efficiency, total carotenoid, and chlorophyll a	Higher pigment content was obtained at 170 °C and 180 °C for <i>I.s galbana</i> and <i>N. oculata</i>
<i>Chlorella</i> and <i>Chrysophyte</i>	Ti: 208 °C, Ci: 78.75 g L ⁻¹ Ti: 220 °C, Ci: 41.86 g L ⁻¹	Moisture content and drying yield	Drying yield and moisture content were significantly affected by inlet temperature and feed concentration
<i>Dunaliella salina</i>	Ti: 200 °C, Sf: 15.43%	β-carotene	Lower outlet temperature yielded higher carotenoid recoveries
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ti: 175 °C	Moisture content and drying yield	Spray-dried <i>Haematococcus pluvialis</i> biomass presented high total carotenoid values and low loss of antioxidant activity

Ti, θερμοκρασία εισόδου; Ci, αρχική συγκέντρωση, Sf, περιεκτικότητα στερεών τροφοδοσίας

Με βάση τα παραπάνω αλλά και με σκοπό την άμεση αξιοποίηση βιοδραστικών ουσιών ως πρόσθετα τροφίμων προχωρήσαμε σε πιλοτική ξήρανση με ψεκασμό εκχυλισμάτων με εμπορικό ενδιαφέρον.

6.7 Ξήρανση με ψεκασμό

Τα εκχυλίσματα τα οποία παρουσίασαν τη βέλτιστη περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη και λιπαρά οξέα εγκλείστηκαν σε μήτρες πολυσακχαριτών μέσω της τεχνικής ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying) ώστε να είναι εφικτή η ενσωμάτωσή τους στα προϊόντα χυμού. Συγκεκριμένα, η υδροφοβικότητα της ασταξανθίνης και των λιπαρών οξέων δεν καθιστά εφικτή την προσθήκη τους σε υδατικά συστήματα. Η διαδικασία εγκλεισμού των εκχυλισμάτων παρουσιάζεται παρακάτω.

Η μαλτοδεξτρίνη διαλύθηκε σε νερό και στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα του εκχυλίσματος. Ακολούθησε ομογενοποίηση του διαλύματος μέσω υπερήχων σε συχνότητα 250 W και χρόνο 10 min. Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο γαλάκτωμα

υπέστη ξήρανση με ψεκασμό σε μια συσκευή τύπου Spray Dryer YC-015A, του οίκου Pilotech Κίνας. Η θερμοκρασία εισόδου και εξόδου του αέρα ρυθμίστηκε ως 150 και 80 °C, αντίστοιχα καθώς επίσης και η ροή της τροφοδοσίας 0.2 kg/h. Τα εγκλεισμένα σωματίδια συλλέχτηκαν και τοποθετήθηκαν σε δοχεία αποθήκευσης στους -30°C μέχρι την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα χυμού.

Κεφάλαιο 7: Μελέτη εφαρμογής των εκχυλισμάτων στη βιομηχανία τροφίμων

7.1 Τομείς Εμπορικών και Βιομηχανικών Εφαρμογών Μικροφυκών

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί ικανοί για τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική ενέργεια μέσω φωτοσύνθεση που περιέχουν πολλές βιοενεργές ενώσεις που μπορούν να αξιοποιηθούν για εμπορική χρήση. Το δυναμικό φωτοσύνθεσης των μικροφυκών για την παραγωγή πολύτιμων ενώσεων ή για ενεργειακή χρήση αναγνωρίζεται ευρέως λόγω της αποτελεσματικότερης χρήσης της ενέργειας του ηλιακού φωτός σε σύγκριση με τα ανώτερα φυτά.

Η πρώτη χρήση μικροφυκών από τον άνθρωπο χρονολογείται 2000 χρόνια πριν στους Κινέζους, οι οποίοι χρησιμοποίησαν το *Nostoc* για να επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της πείνας. Ωστόσο, η βιοτεχνολογία μικροφυκών μόνο άρχισε πραγματικά να αναπτύσσεται στα μέσα του περασμένου αιώνα. Ιδιαίτερα η έντονη εμπορική καλλιέργεια μικροφυκών είναι πια άνω των 30 ετών με τα κύρια είδη μικροφυκών που καλλιεργούνται να είναι η *Chlorella* και η *Spirulina* για προϊόντα υγιεινής διατροφής, η *Dunaliella salina* για την παραγωγή β-καροτενίου, το *Haematococcus pluvialis* για την παραγωγή ασταξανθίνης και διάφορα είδη για την υδατοκαλλιέργεια [444]. Τα συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται σήμερα για την καλλιέργεια αυτών των μικροφυκών είναι γενικά αρκετά απλά και η τεχνολογία για αποδοτικές μονάδες είναι πλέον διαθέσιμη.

Για παράδειγμα, η *Dunaliella salina* καλλιεργείται σε μεγάλες (μέχρι περίπου 250 εκτάρια) ρηχές υπαίθριες λίμνες χωρίς τεχνητή ανάμειξη. Ομοίως και αντίστοιχα, η *Chlorella* και η *Spirulina* καλλιεργούνται επίσης σε εξωτερικούς χώρους είτε σε μικτές λίμνες με τροχούς ή σε κυκλικές λίμνες με περιστρεφόμενο βραχίονα ανάμειξης μεγέθους έως περίπου 1 εκτάριο ανά λίμνη. Η παραγωγή μικροφυκών για υδατοκαλλιέργεια είναι γενικά σε πολύ μικρότερη κλίμακα και σε πολλές περιπτώσεις πραγματοποιείται σε εσωτερικούς χώρους σε δοχεία 20-40 λίτρων ή σε μεγάλες πλαστικές σακούλες όγκου έως περίπου 1000 λίτρων. Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα ελικοειδές σωληνωτό σύστημα φωτοβιοαντιδραστήρα, το BIOCOIL™, το οποίο επιτρέπει σε αυτά τα φύκια να αναπτύσσονται αξιόπιστα σε εξωτερικούς χώρους σε υψηλές πυκνότητες κυττάρων σε ημισυνεχή καλλιέργεια ενώ έχουν αναπτυχθεί και άλλοι κλειστοί επίπεδοι τύπου πάνελ φωτοβιοαντιδραστήρες.

Το κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η εμπορευματοποίηση νέων μικροφυκών και προϊόντων μικροφυκών είναι η ανάγκη για κλειστά συστήματα καλλιέργειας και το γεγονός ότι αυτά είναι υψηλής έντασης κεφαλαίου. Το υψηλό κόστος των συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών σχετίζεται με την ανάγκη για φως και τον σχετικά αργό ρυθμό ανάπτυξης των φυκών. Αν και αυτό το πρόβλημα έχει αποφευχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις με την καλλιέργεια των φυκών ετεροτροφικά, δεν μπορούν να παραχθούν όλα τα μικροφύκη ή τα προϊόντα φυκών με αυτόν τον τρόπο και για το σκοπό αυτό αναζητούνται οι βέλτιστες μέθοδοι καλλιέργειας.

Οι βασικές κατηγορίες εμπορικών εφαρμογών των μικροφυκών μετά την συγκομιδή τους παρουσιάζονται στο Σχήμα 11 και είναι οι εξής [445]:

- Πρόσθετα τροφίμων και φαρμακευτικών σκευασμάτων
- Πρόσθετα καλλυντικών
- Πρόσθετα Ζωοτροφών και Ιχθυοτροφών
- Παραγωγή βιοαερίων και βιοντήζελ
- Εξυγίανση υδάτινου περιβάλλοντος (θαλάσσιου ή γλυκού νερού)
- Εδαφοβελτιωτικά



Σχήμα 11. Μικροφύκη: από την συγκομιδή στην κατανάλωση

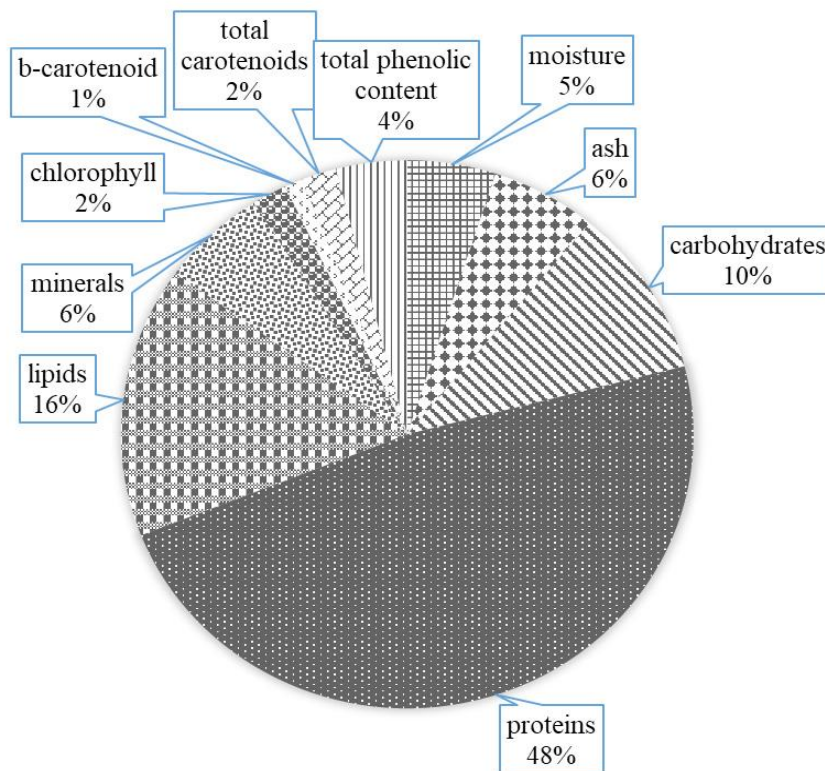
Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι τα μικροφύκη μπορούν να είναι εργαλεία πράσινης ανάπτυξης για την δημιουργία μηχανισμών αξιοποίησης παραπροϊόντων ή ακόμη και λυμάτων μιας βιομηχανίας για την παραγωγή συστατικών και προϊόντων σημαντικής προστιθέμενης αξίας. Στους Πίνακες Π2 και Π3 του **παραρτήματος 2** παρουσιάζονται αποτελέσματα μελέτης για τις εφαρμογές των μικροφυκών στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών [446].

Έχοντας υπόψη όλα αυτά τα παραδείγματα βιομηχανικής κλίμακας, θα αναφερθούμε παρακάτω σε δύο εφαρμογές των μικροαλγών στη βιομηχανία.

7.2 Αντικατάσταση Ζωικών Λιπαρών και Πρωτεϊνών με Εκχυλίσματα Μικροαλγών

Τα ζωικά λιπαρά και οι πρωτεΐνες όπως αυτά του γάλακτος και των αυγών είναι βασικά συστατικά στη ζαχαροπλαστική και την αρτοποιία. Έχουν μάλιστα κατηγορηθεί ιδιαίτερα για αλλεργίες αλλά και ως υπεύθυνα για την παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου II. Η αναζήτηση εναλλακτικών συστατικών μας δημιούργησε το κίνητρο να αναζητήσουμε λύση σε παραγόμενες από μικροάλγη πρωτεΐνες καθώς και Ω3 και Ω6 λιπαρά οξέα. Για τον σκοπό αυτό και συγκεκριμένα για τη δοκιμή υποκατάστασης σε ψωμί τύπου *brioche* επιλέχθηκε το μικροφύκος της *Chlorella vulgaris* [447].

Η *Chlorella vulgaris* είναι ένα στέλεχος μικροφυκών όπου το 48% της βιομάζας του αποτελείται από πρωτεΐνες. Τα λιπαρά στο *C. vulgaris* αποτελούν το 16% της βιομάζας, ενώ το ποσοστό των υδατανθράκων και των μετάλλων είναι 10% και 6%, αντίστοιχα. Η *Chlorella vulgaris* είναι ένα ευεργετικό στέλεχος μικροφυκών με μεγάλη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά υψηλής αξίας, η οποία αποτελείται τόσο από κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) όσο και από υγιεινά ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία έχουν είτε έναν διπλό δεσμό άνθρακα και ονομάζονται μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), ή περιέχουν περισσότερα από ένα διπλό δεσμό άνθρακα στο μόριο τους και είναι ονομάζονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Το υψηλότερο ποσοστό λίπαρών στο *C. vulgaris* είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), όπως ωμέγα-3 (N-3) και ωμέγα-6 (N-6) λιπαρά οξέα [448]. Η σύσταση του *C. vulgaris* φαίνεται γραφικά στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18. Σύνθεση του *Chlorella vulgaris* (Tokusoglu and Ünal 2003)

Αυτά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), έχουν αποδεδειγμένη ευεργετική επίδραση για την ανθρώπινη υγεία [449, 450]. Ο Πίνακας 33 συνοψίζει την κλασμάτωση λιπιδίων του *C. vulgaris*, που δείχνει την αναλογία κάθε κατηγορίας λιπιδίων ως μέρος της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια. Λόγω του περιεχομένου του σε βιοδραστικές ενώσεις, ο *C. vulgaris* δρα ως αντιγηραντικό και αντιοξειδωτικό παράγοντα και ενισχύει το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα [451].

Lipid	% total lipids
SFA	23%
MUFA	37%
PUFA	40%
N-3	30%
N-6	10%
N-9	40%
Others	20%

Πίνακας 33. Αναλογίες των λιπαρών του *Chlorella vulgaris* (Tokusoglu and Ünal 2003)

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του και της ποιότητάς του σε πρωτεΐνες και λιπαρά, το *C. vulgaris* είναι μια σημαντική πηγή για εκχύλιση. Εφαρμόσαμε την εκχύλιση με υπερήχους για βέλτιστη απόδοση, καθώς η προσθήκη υπερήχων ως προεπεξεργασία βοηθά την κυτταρική διάσπαση και διευκολύνει τη διείσδυση διαλυτών μέσα στο κύτταρο [452, 453]. Η επιλογή των διαλυτών βασίζεται στη βασική χημική έννοια του "όμοιο να διαλύεται σε όμοιο". Οι πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας νερό, ενώ τα λιπαρά χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες και, πιο συγκεκριμένα, ένα συνδυασμό μη πολικών και πολικών διαλυτών.

Οι εναλλακτικές που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα για την αντικατάσταση των λιπαρών και των πρωτεϊνών δεν έχουν πάντα ικανοποιητικά αποτελέσματα κυρίως οργανοληπτικά. Για το σκοπό αυτό αναζητήθηκαν νέες και καινοτόμες λύσεις με τη χρήση των μικροφυκών.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ανάπτυξη υποκατάστατων του ζωικού λίπους και των ζωικών πρωτεϊνών που προέρχονται από το *C. vulgaris*, με στόχο την πλήρη αξιοποίηση των ευεργετικών επιδράσεών τους ανθρώπινη υγεία. Τα λιπαρά οξέα και οι πρωτεΐνες που εξάγονται από το *C. vulgaris* μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τα συστατικά-στόχους, και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη προϊόντων με πανομοιότυπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και να συνδράμουν στη βελτίωση της ποιότητάς των και μειώνοντας πιθανές αρνητικές επιπτώσεις τους στην υγεία.

Για την εκχύλιση λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν μόνο διαλύτες κατάλληλοι για τρόφιμα, χωρίς περιβαλλοντικές επιπτώσεις, με βάση την νομοθεσία της ΕΕ (2009/32/ΕΚ) και την ικανότητα των βιομηχανιών τροφίμων για να τα χρησιμοποιήσετε σε όλα τα στάδια επεξεργασίας. Για την εκχύλιση λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα οργανικών μη πολικών και πολικών διαλυτών, και ιδίως εξάνιο:ισοπροπανόλη, για την επίτευξη της βέλτιστης ανάκτησης [454]. Για την εκχύλιση πρωτεϊνών, η υπολειμματική βιομάζα από την εκχύλιση των λιπιδίων υποβλήθηκε σε επεξεργασία με απιονισμένο νερό και θειικό αμμώνιο για την απομόνωση πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο υγρό λυοφιλοποιήθηκε για να παραχθεί ξηρή σκόνη πρωτεϊνών χωρίς ρύπους. Τόσο τα εκχυλίσματα λιπιδίων όσο και πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ψημένων προϊόντων τύπου μπριός (brioche) με πλήρη αντικατάσταση των αυγών και του βουτύρου γάλακτος, και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική εκτίμηση αυτών των λειτουργικών προϊόντων από

είκοσι αξιολογητές. Κατά τη διάρκεια τη διαδικασία της ανάπτυξης των νέων προϊόντων τύπου Brioche, έγιναν δείγματα με διάφορα ποσοστά υποκατάστασης ζωικού λίπους και πρωτεϊνών προκειμένου να επιτευχθούν τα βέλτιστα επίπεδα αντικατάστασης. Ωστόσο, σύμφωνα με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, η πλήρης (100%) υποκατάσταση ζωικού λίπους και πρωτεΐνης είχε τη μεγαλύτερη αποδοχή.

7.2.1 Μεθοδολογία

Υλικά

Το πείραμα ξεκίνησε τον Σεπτέμβριο του 2016 και τελείωσε τον Ιούλιο του 2017 στη Σχολή Χημικών Μηχανολογία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Ελλάδα. Ξηρή βιομάζα του *C. vulgaris* για εμπορική χρήση (παραχθέν από την MegaFoods) χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή λεπτή σκόνης. Οι διαλύτες προμηθεύτηκαν από τη Sigma-Aldrich και περιλαμβάνουν ακετόνη (90%), ακετόνη (80%), μεθανόλη (90%), αιθανόλη (95%), διάλυμα φωσφορικού οξέος (85% w/v), εξάνιο (95%), ισοπροπανόλη (αναλυτικής καθαρότητας), νάτριο ανθρακικό διάλυμα (1N) και θειικό οξύ (αναλυτικό βαθμός). Επιπλέον, HgI₂, KI, τρυγικό νάτριο καλίου τετραένυδρο (KNaC₄H₄O₆·4H₂O), Coomassie Brilliant Blue G-250 και άνυδρο γλωριούχο αμμώνιο (>95%) αγοράστηκαν από τη Sigma Aldrich. Ακόμη, άνυδρο υδροξείδιο του νατρίου και θειικό αμμώνιο (αναλυτικού βαθμού) προμηθεύτηκαν από τη Merck. Καθαρός άνθρακας σε σκόνη αγοράστηκε από την εταιρεία Aromatherapy. Το αντιδραστήριο φαινόλης του Folin-Ciocalteu προερχόταν από τη Merck, και αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς αγοράστηκε από την PANBiotech. Τελικά, χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό οξύ 85% (w/v) από την Chem-Lab NV. Για την παραγωγή προϊόντων αρτοποιίας, τα ακόλουθα τα υλικά αγοράστηκαν από την τοπική αγορά: αλεύρι, μαγιά, αλάτι, φοινικέλαιο, βούτυρο γάλακτος (82%), ζάχαρη, ενισχυτικό brioche, παστεριωμένο φρέσκο αυγό, προπιονικό οξύ και άρωμα βανίλιας.

Μέθοδοι

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Χαρακτηρισμός των συστατικών του *Chlorella vulgaris*: καροτενοειδή, γλωροφύλλη, φαινολικές ενώσεις, λιπαρά και πρωτεΐνες
- Ανάπτυξη των πρωτοκόλλων εκχύλισης λιπαρών και πρωτεϊνών
- Παραγωγή των τελικών προσθέτων: καθαρισμό και αποχρωματισμό λιπαρών και ξήρανση πρωτεϊνών

- Ανάλυση της ποιότητας των προσθέτων
- Αντικατάσταση των ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών με αυτά του μικροφύκους

Τα συστατικά που αναλύσαμε μετά την εκχύλιση του μικροάλγους *Chlorella vulgaris* παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 34.

Συστατικό	% Περιεκτικότητα επί ξηρής μάζας
Ολικά καροτενοειδή	2,70
Β-Καροτένιο	1,02
Ολικές Χλωροφύλλες	1,10
Χλωροφύλλη Α	0,63
Χλωροφύλλη Β	0,35
Χλωροφύλλη C	0,12
Ολικά Φαινολικά	4,67
Λιπαρά	13,00
Πρωτεΐνες	8,30

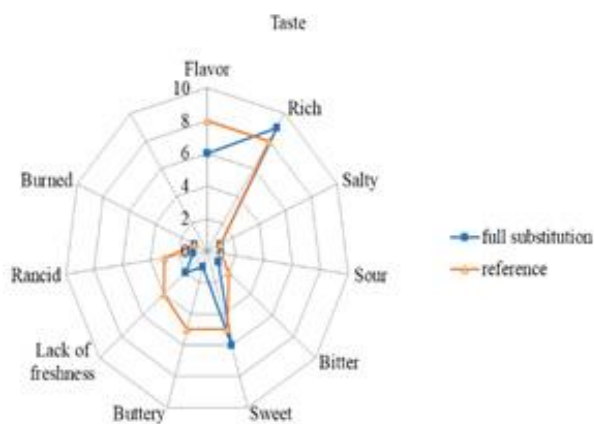
Πίνακας 34. Περιεκτικότητα του *Chlorella vulgaris* σε βιοδραστικά συστατικά

Ακολουθώντας την τυπική συνταγή που παρουσιάζεται στο **παράρτημα 3/Α** έγινε παραγωγή των τελικών προϊόντων και αξιολογήθηκαν σε σχέση με το τυπικό. Η εξωτερική εμφάνιση του νέου μπριός της Εικόνας 19 ταυτιζόταν με αυτή του τυπικού ενώ πλεονεκτεί σε πολλά στοιχεία που αναλύονται παρακάτω.

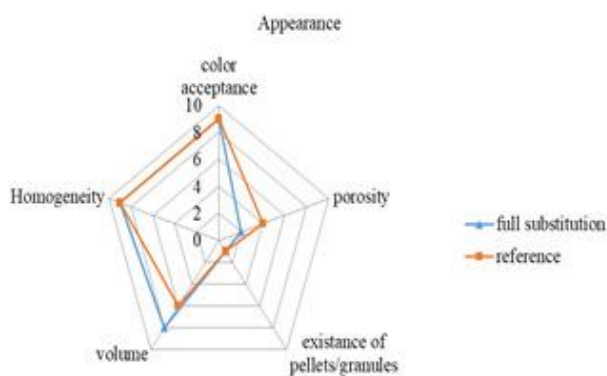


Εικόνα 19. Παραγόμενο τελικό μπριός μετά την ολική αντικατάσταση ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών

Τα χαρακτηριστικά της οργανοληπτικής ανάλυσης που λαμβάνονται υπόψη παρουσιάζονται επίσης στο **παράρτημα 3/Β** καταλήξαμε να έχουμε μετά από τους οργανοληπτικούς ελέγχους τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 20 και 21 [447].



Εικόνα 20. Αποτελέσματα οργανοληπτικών δοκιμών γεύσης



Εικόνα 21. Αποτελέσματα οργανοληπτικών δοκιμών υφής και εμφάνισης

7.2.2 Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των παραπάνω ευρημάτων προκύπτει ότι μπορεί να γίνει πλήρη υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών στην συνταγή ενός αρτοσκευάσματος τύπου μπριός από αυτά που παράγονται και εκχυλίζονται από το μικρόαλγος *Chlorella vulgaris*. Το τελικό προϊόν δεν έδειχνε ιδιαίτερες διαφορές στην οργανοληπτική ανάλυση συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων γεύσης, οσμής, χρώματος, δομής και υφής σε σχέση με το τυπικό προϊόν αναφοράς. Αυτό για να συμβεί απαιτούνται ιδιαίτερες προκατεργασίες στα εκχυλιζόμενα πρόσθετα ώστε να ελαχιστοποιηθούν μη επιθυμητά οργανοληπτικά στοιχεία.

Επιπλέον το προϊόν με την προσθήκη των Ω3 λιπαρών συνάμα με τα πρόσθετα αντιοξειδωτικά από το εκχύλισμα του μικροφύκου, αποκτά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής αλλά και μια αίσθηση φρεσκότητας για μακρότερο χρονικό διάστημα.

7.3 Προσθήκη Ω3 λιπαρών οξέων και ασταξανθίνης σε χυμούς φρούτων για τη δημιουργία λειτουργικών ροφημάτων

Η αγορά χυμών και αναψυκτικών είναι αρκετά σύνθετη και ανταγωνιστική. Η προσθήκη ιδιαίτερων βιοδραστικών φυσικών ουσιών είναι σίγουρα μία πρόκληση. Υπάρχουν μια σειρά από τεχνικά και εμπορικά ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν.

Για τη σύνθεση των προϊόντων θα επιλέξουμε μεσογειακές πρώτες ύλες που προδίδουν γεύσεις ευρέως αποδεκτές. Η ενσωμάτωση των προσθέτων γίνεται στο προϊόν εφόσον πρώτα γαλακτωματοποιηθούν και ομογενοποιηθούν.

Ακολούθως γίνονται φυσικοχημικές και οργανοληπτικές δοκιμές για την αποδοχή του προϊόντος από εξειδικευμένους δοκιμαστές. Τέλος, προσδιορίζεται ο χρόνος ζωής και οι συνθήκες συντήρησης του προϊόντος.

7.3.1 Μεθοδολογία

Τα ανεπτυγμένα πρόσθετα (καροτενοειδείς χρωστικές ουσίες που λαμβάνονται από το μικροφύκος *H. pluvialis*) εφαρμόζονται ως χρωστικές, σε ένα εμπορικά χρησιμοποιούμενο προϊόν. Αυτό το ενισχυτικό συστατικό προστίθεται ως χρωστική σε μια εργαστηριακά προσομοιωμένη γραμμή παραγωγής. Δύο διαφορετικές εκδόσεις από το “νέο” προϊόν προετοιμάζονται και συγκρίνονται με το χυμό που παράγεται με τη “συμβατική” χρωστική ουσία. Για την ανάπτυξη και εμπορική παραγωγή προϊόντων χυμών που περιέχουν ασταξανθίνη από την εκχύλιση μικροφυκών έχουν δημιουργηθεί δύο νέες εκδόσεις για δύο συνταγές χυμού. Όλα βασίζονται σε Μεσογειακές πρώτες ύλες και έχουν ήδη επιτυχημένη πορεία στην Ελληνική αγορά ως τυπικές γεύσεις με τις συμβατικές επιλογές ως χρωστικές.

Επιπλέον θα γίνει δοκιμή για την παραγωγή προϊόντων χυμών εφαρμόζοντας τα ανεπτυγμένα πρόσθετα (EPA και DHA) που λαμβάνονται από το διάτομο *P. Tricornutum* και ενσωματώνονται σε γαλάκτωμα πριν προστεθούν στον χυμό. Σκοπός είναι τα λαμβανόμενα λιπαρά οξέα EPA και DHA να προστίθενται σε ενεργειακούς χυμούς φρούτων που απευθύνονται και σε παιδιά.

Είναι πολύ σημαντικό να παρουσιαστεί η πολυλειτουργική συμπεριφορά των ανεπτυγμένων αυτών προσθέτων. Ως εκ τούτου, τα προϊόντα χυμών που θα

αναπτυχθούν θα ελεγχθούν στην επόμενη δραστηριότητα για τα διατροφικά τους χαρακτηριστικά. Τέλος, αυτός ο τύπος χυμών θα ελεγχθεί για την αποδοχή του από τους καταναλωτές από πιστοποιημένη ομάδα δοκιμαστών.

Τα τελικά προϊόντα χυμών που έχουν αναπτυχθεί με τη χρήση προσθέτων από μικροφύκη θα συσκευάζονται σε εμπορικά υλικά συσκευασίας και θα αποθηκεύονται σε ελεγχόμενες συνθήκες. Θα εφαρμοστεί τεχνητή γήρανση με την μέθοδο της Ασπίς ΑΕ και θα μετρηθούν τα διατροφικά χαρακτηριστικά των μοντέλων-προϊόντων χυμών, που παρασκευάζονται στην προηγούμενη δραστηριότητα. Επιπλέον, θα μετρηθούν η αντιοξειδωτική ικανότητα και η διατήρηση του χρώματος του προϊόντος στο χρόνο ζωής του, ώστε να μελετηθεί η πολυλειτουργική επίδραση των χρησιμοποιούμενων προσθέτων. Η ποιότητα και οι θρεπτικοί δείκτες του “νέου” προϊόντος θα συγκριθούν με τους δείκτες του προϊόντος (που χρησιμοποιείται ως προϊόν ελέγχου) που έχει παρασκευαστεί με τα “συμβατικά” πρόσθετα. Τα brix αντανakλούν τα διαλελυμένα στερεά και έχουν προσδιορισθεί διαθλασιμετρικά με RM340 της Bellingham + Stanley, η ολική οξύτητα εκφράζεται ως άνυδρο κιτρικό οξύ και μετράται με αυτόματο τιτλοδότη της Mettler Toledo, το χρώμα εκφράζεται ως L*,a*,b* και μετράται με χρωματόμετρο HunterLab, ενώ η βιταμίνη C προσδιορίζεται ενζυματικά και κατόπιν χρωματομετρικά με φασματοφωτόμετρο RQ Flex ή Aquamate.

Επίσης, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των “νέων” προϊόντων χυμού (και των προϊόντων ελέγχου με την ίδια ημερομηνία παραγωγής) θα διεξαχθούν οργανοληπτικές δοκιμές αξιολόγησης από μια ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Θα αξιολογηθούν η οπτική εμφάνιση, το χρώμα, η φωτεινότητα, η υφή και η γεύση. Αυτή η δοκιμή αποδοχής θα διεξαχθεί με τη χρήση ημιδομημένων κλιμάκων, με βαθμό από 1 (χαμηλότερο) έως 9 (υψηλότερο) υπολογίζοντας την μέση απόκριση του κάθε προϊόντος. Επίσης θα διεξαχθεί μια δοκιμή αποδοχής με ηδονική κλίμακα. Η συνολική αποδοχή των προϊόντων θα υπολογιστεί με βάση την επίδραση και θα χρησιμοποιηθεί η κλίμακα του IFU No25. Τα προϊόντα αυτά εμπλουτίζονται με εκχύλισμα μικροφυκών ώστε να αποτελέσουν τρόφιμα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Οι εκδόσεις για το κάθε είδος χυμού έχουν ως εξής:

1Α. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο

1Β. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με ασταξανθίνη, 0,05%

1C. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με ασταξανθίνη, 0,1%

1D. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με εκχύλισμα EPA και DHA, 3%

2A. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο

2B. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με ασταξανθίνη, 0,05%

2C. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με ασταξανθίνη, 0,1%

2D. Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με εκχύλισμα EPA και DHA, 3%

Η τυπική συνταγή για το χυμό μήλο-πορτοκάλι-καρότο παρουσιάζεται στο **Παράρτημα 4** στον Πίνακα 1A και δείχνει τόσο τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων όσο και τις ενδεδειγμένες τεχνικές παραγωγής. Στη συνέχεια τροποποιήθηκε η αρχική συνταγή αλλάζοντας την περιεκτικότητα του Μαύρου Καρότου με την προσθήκη ασταξανθίνης σε ποσοστό 0,1% στην έκδοση 1B και 0,15% στην έκδοση 1C αφαιρώντας σε κάθε περίπτωση την αντίστοιχη ποσότητα στη συνταγή από το μαύρο καρότο, ενώ στην έκδοση 1D προσθέτουμε εκχύλισμα EPA, DHA 3% και αφαιρούμε το σύνολο του μαύρου καρότου (2%) καθώς και μέρος από τον χυμό καρότου (1%). Στο ίδιο **Παράρτημα 4** και στον Πίνακα 1B παρουσιάζουμε τις προδιαγραφές και τις συνθήκες παραγωγής του παραπάνω προϊόντος. Ακολούθως στο **Παράρτημα 4** και στους Πίνακες 1C, 1D και 1E παρουσιάζουμε τις τελικές συνταγές. Αντίστοιχα για το προϊόν Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με προσθήκη ασταξανθίνης 0,05% και 0,1% καθώς και με εκχύλισμα EPA και DHA 3% έχουμε στο **Παράρτημα 4** τους Πίνακες 2A έως 2D. Σε όλες τις περιπτώσεις ότι προσθέτουμε σε δραστικές ουσίες αφαιρείται αντίστοιχη ποσότητα από το χυμό μανταρινιού.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι προκειμένου να επιτευχθεί η εμπορική παραγωγή προϊόντων χυμών που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την εκχύλιση μικροφυκών έχουν δημιουργηθεί συνταγές με τα εκχυλίσματα EPA & DHA ώστε να αποτελούν τρόφιμα με ιδιαίτερα θρεπτικά χαρακτηριστικά και μάλιστα να μπορούν να φέρουν και διατροφικούς ισχυρισμούς υγείας (Health Claims) εγκεκριμένους από την αρμόδια Ευρωπαϊκή αρχή (EFSA). Επίσης, επισημαίνουμε το γεγονός ότι

παραμένουμε στην παραγωγή ενός προϊόντος με 100% φυσικές πρώτες ύλες καθώς και ο διαλύτης εκχύλισης είναι εκχύλισμα από εσπεριδοειδή και συνεπώς δεν απαιτείται επιπλέον ιδιαίτερη σήμανση στην ετικέτα του προϊόντος.

7.3.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Τελικά, για τον έλεγχο των ποιοτικών χαρακτηριστικών των νέων προϊόντων έχει υιοθετηθεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση ελέγχοντας τις ποιοτικές αλλαγές (φυσικοχημικά, μικροβιολογικά, θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά) των προϊόντων κατά την αποθήκευσή τους σε επιλεγμένα υλικά συσκευασίας και στοχεύοντας στη διατήρηση των ποιοτικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 35 και δείχνουν την συμβατότητα των νέων προϊόντων με τις προδιαγραφές.

Προϊόν	Brix	Density D20/20	Citric Acid (mg/g)	pH	L*	a*	b*	Vit C (mg/l)
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ	11,75	1.047	3,62	3,73	38,87	18,54	38,70	149
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, Astaxanthin 0,1%	11,85	1.047	3,04	3,81	46,49	19,86	45,67	129
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, Astaxanthin 0,15%	11,73	1.046	3,93	3,76	47,43	20,04	47,30	115
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, EPA Emul 3%	11,86	1.047	5,48	3,77	43,82	19,49	41,98	189
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ	12,49	1.050	5,84	3,57	39,10	3,98	35,54	147
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, Astaxanthin 0,05%	12,57	1.051	5,90	3,66	45,83	3,56	42,15	114
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, Astaxanthin 0,1%	12,37	1.050	5,82	3,61	48,05	2,68	42,49	113
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, EPA Emul. 3%	12,51	1.050	6,28	3,66	44,37	7,37	43,06	171

Πίνακας 35. Κρίσιμες Φυσικές και Χημικές Παράμετροι των Προϊόντων Χυμών χωρίς και με βιοδραστικά συστατικά

Επίσης, προσδιορίζεται η επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης (θερμοκρασία, χρόνος, απουσία οξυγόνου και ένταση φωτός) στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, σύμφωνα με κατάλληλη μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής και περιγράφεται μαθηματικά. Η μαθηματική συσχέτιση της διάρκειας ζωής με τις συνθήκες συντήρησης προσφέρει ένα εργαλείο προσδιορισμού της βέλτιστης βιωσιμότητας των ανεπτυγμένων προϊόντων.



Εικόνα 22. Τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν, αναλύθηκαν και ακολούθησαν τεχνητή γήρανση και ελέγχθηκαν ως προς την μεταβολή του χρώματος

Η τεχνική αυτή προσφέρει την δυνατότητα πρόρρησης της διάρκειας ζωής των προϊόντων σε οποιοδήποτε χρονικό και θερμοκρασιακό προφίλ συντήρησης του προϊόντος. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αναφορικά με τις συνθήκες διατήρησης και το χρόνο ζωής των προϊόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 36. Σε αυτόν φαίνεται λοιπόν η ευαισθησία των προϊόντων στη θερμοκρασία και στην έκθεση στο οξυγόνο και το φως.

Πίνακας 36. Κρίσιμες Φυσικές και Χημικές Παράμετροι των Προϊόντων Χυμών χωρίς και με βιοδραστικά συστατικά σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας και αποθήκευσης

Συνθήκες	Προϊόν	Brix	pH	L*	a*	b*	Vit C (mg/l)
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ	11,75	3,73	38,87	18,54	38,70	149
T1, 25C, Transparent Pack		11,71	3,73	34,19	17,12	36,95	128
T1, 25C, Dark Pack		11,76	3,72	37,15	17,56	37,19	136
T1, 8C, Dark Pack		11,71	3,73	38,12	18,12	38,21	140
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, Astaxanthin 0,1%	11,85	3,81	46,49	19,86	45,67	129
T1, 25C, Transparent Pack		11,87	3,82	45,28	18,21	44,95	120
T1, 25C, Dark Pack		11,82	3,81	45,75	18,88	45,22	122
T1, 8C, Dark Pack		11,74	3,8	46,11	19,16	45,52	125
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, Astaxanthin 0,15%	11,73	3,76	47,43	20,04	47,30	115
T1, 25C, Transparent Pack		11,72	3,77	46,98	19,1	46,52	104
T1, 25C, Dark Pack		11,72	3,76	47,25	19,24	46,85	109
T1, 8C, Dark Pack		11,72	3,76	47,35	19,65	46,96	110
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, EPA Emul 3%	12,56	3,77	43,82	19,49	41,98	189
T1, 25C, Transparent Pack		12,71	3,78	43,21	19,24	41,36	171
T1, 25C, Dark Pack		12,61	3,78	43,51	19,31	41,38	173
T1, 8C, Dark Pack		12,55	3,77	43,72	19,34	41,49	182

T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ	12,49	3,57	39,10	3,98	35,54	147
T1, 25C, Transparent Pack		12,49	3,57	36,52	3,22	34,19	122
T1, 25C, Dark Pack		12,51	3,56	37,61	3,32	34,77	128
T1, 8C, Dark Pack		12,48	3,58	38,05	3,56	34,91	134
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, Astaxanthin 0,05%	12,57	3,66	45,83	3,56	42,15	114
T1, 25C, Transparent Pack		12,55	3,67	44,15	3,42	41,11	101
T1, 25C, Dark Pack		12,54	3,64	44,86	3,48	41,58	104
T1, 8C, Dark Pack		12,57	3,64	45,61	3,51	41,88	109
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, Astaxanthin 0,1%	12,37	3,61	48,05	2,68	42,49	113
T1, 25C, Transparent Pack		12,31	3,6	47,17	2,51	41,35	102
T1, 25C, Dark Pack		12,33	3,59	47,65	2,61	41,62	106
T1, 8C, Dark Pack		12,35	3,6	47,81	2,62	41,87	107
T0	ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, EPA Emul. 3%	11,86	3,66	44,37	7,37	43,06	171
T1, 25C, Transparent Pack		11,86	3,65	43,55	7,21	42,23	159
T1, 25C, Dark Pack		11,86	3,65	43,62	7,29	42,58	164
T1, 8C, Dark Pack		11,87	3,67	43,92	7,31	42,76	165

Σημαντικές παράμετροι που μελετούμε είναι η αλλαγή στο χρώμα του προϊόντος και η διατηρησιμότητα της βιταμίνης C μετά την τεχνητή γήρανση που αντικατοπτρίζουν την αντιοξειδωτική ανθεκτικότητα αυτών. Ο έλεγχος γίνεται σε τρεις συνθήκες για 14 ημέρες. Στην πρώτη περίπτωση ο περιέκτης είναι διάφανος PET και το προϊόν εκτίθεται σε ηλιακή ακτινοβολία στους 25 °C, στη δεύτερη περίπτωση το προϊόν είναι συσκευασμένο σε αδιαφώτιστο περιέκτη – αντίστοιχο της Τετραπάκ- ενώ εκτίθεται σε ηλιακή ακτινοβολία στους 25 °C και τέλος στην τρίτη περίπτωση το προϊόν είναι συσκευασμένο σε αδιαφώτιστο περιέκτη – αντίστοιχο της Τετραπάκ- και τοποθετείται στο ψυγείο στους 8°C. T0 είναι ο χρόνος που ξεκινά η ανάλυση του χρόνου ζωής και συνεπώς το δείγμα μάρτυρας για κάθε μία από τις ελεγχόμενες γεύσεις.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών προϊόντων πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της μελέτης της διάρκειας ζωής τους από εκπαιδευμένους δοκιμαστές με τριγωνικές δοκιμές και ηδονική βαθμολόγηση. Εφαρμόζεται η ανάλυση Weibull-Hazard με τις κατάλληλες στατιστικές διαδικασίες για την αξιολόγηση των

αποτελεσμάτων που θα λαμβάνονται. Τα αποτελέσματα τις αξιολόγησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 37.

Πίνακας 37. Οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών προϊόντων

Προϊόν	Γενική				Σύνολο
	Εμφάνιση	Χρώμα	Άρωμα	Γεύση	
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο	4	3	6	10	23
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με ασταξανθίνη 1A	4	4	6	9	23
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με ασταξανθίνη 1B	4	4	6	9	23
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, καρότο με EPA και DHA, 1C	4	4	6	9	23
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο	4	3	6	10	23
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με ασταξανθίνη 2A	4	4	6	10	24
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με ασταξανθίνη 2B	4	4	6	8	22
Χυμός μήλο, πορτοκάλι, μανταρίνι, βερίκοκο με EPA και DHA. 2C	4	4	6	9	23

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των προϊόντων η οργανοληπτική συμπεριφορά των νέων προϊόντων ήταν εκείνη που απασχόλησε περισσότερο την ερευνητική ομάδα. Η προσθήκη των νέων βιοδραστικών ουσιών επηρεάζει το γευστικό και αρωματικό προφίλ των προϊόντων και απαιτούνται ιδιαίτερα εξειδικευμένες επεμβάσεις στη σύνθεση και τον αρωματισμό αυτών ώστε να γίνουν αποδεκτά από τους δοκιμαστές. Για τον προσδιορισμό της εμπορικής καταλληλότητας επιλέχθηκε η αξιολόγηση με τη μέθοδο του IFU No 25 με schemes A & B. Μόνο τα πλέον αποδεκτά δείγματα, εκείνα που πέτυχαν αποτέλεσμα δοκιμής μεγαλύτερο από 75% επεξεργάστηκαν σε τελικά.

Από τα αποτελέσματα των συνθηκών αποθήκευσης που παρουσιάστηκαν ήδη στον πίνακα 36 διαπιστώνουμε όπως και ήδη αναφέρθηκε ότι δείχνουν την ευθεία εξάρτηση της διάρκειας ζωής από τις συνθήκες διατήρησης. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι μικρή οξείδωση των προϊόντων που συνεπάγεται περιορισμένη οξείδωση των πρόσθετων βιοδραστικών ουσιών προκαλεί εξαιρετικά σημαντική οργανοληπτική υποβάθμιση του προϊόντος και το καθιστά μη εμπορικό. Συνεπώς, από την ανάλυση των δεδομένων των Πινάκων 36 και 37 προέκυψε ο Πίνακας 38 που προσδιορίζει μόνο την ανάλυση της διάρκειας ζωής για κάθε προϊόν σε μία συσκευασία στις ενδεδειγμένες συνθήκες συντήρησης. Τα προϊόντα αυτά επιλέχθηκαν από την ομάδα δοκιμαστών ως

τα πλέον ενδιαφέρονται από εμπορική άποψη και προοπτική αποδοχής από τους καταναλωτές.

Πίνακας 38. Χρόνος Ζωής και Συνθήκες Συντήρησης των Παραγόμενων Επιλεγμένων Προϊόντων

Προϊόν	Συνθήκες		
	Θερμοκρασία	Περιέκτης	Χρόνος Ζωής, μήνες
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, Astaxanthin 0,1%	Περιβάλλον	Τετραπάκ	12
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, Astaxanthin 0,05%	Περιβάλλον	Τετραπάκ	8
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΚΑΡΟΤΟ, EPA Emul 3%	Περιβάλλον	Τετραπάκ	8
ΜΗΛΟ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ, ΜΑΝΤΑΡΙΝΙ, ΒΕΡΙΚΟΚΟ, EPA Emul. 3%	Ψυγείο 4-8 °C	Τετραπάκ	4

Σημαντική παράμετρος για την μείωση του χρόνου ζωής στα προϊόντα με Ω3 λιπαρά οξέα είναι η επαναφορά αμυδρού γευστικού τόνου ιχθύος που αντιλαμβάνονταν οι δοκιμαστές μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Για όλα τα προϊόντα έγιναν δοκιμές χρόνου ζωής και ένα τυπικό παράδειγμα για το χυμό μήλο-πορτοκάλι-καρότο με Ασταξανθίνη 0,1%, υπάρχει στο **Παράρτημα 5**. Πρέπει σίγουρα να σημειωθεί ότι έχει υπάρξει προκατεργασία με απόσπηση των λιπαρών οξέων και την πρόσμιξή τους σε γαλάκτωμα με παράγοντες ουδετεροποίησης του αρώματος.

Από την παραπάνω μελέτη φαίνεται ότι είναι εφικτή η εφαρμογή των εκχυλισμάτων μικροφυκών στη βιομηχανία χυμών με δυνατότητα να παραχθούν προϊόντα με ιδιαίτερα διατροφικά χαρακτηριστικά και μάλιστα με διατροφικούς ισχυρισμούς. Είναι βέβαιο ότι υπάρχουν μεγάλες δυσκολίες στη χρήση αυξημένων ποσοστών τέτοιων εκχυλισμάτων χωρίς να προηγηθούν επεξεργασίες απόσπησης και βελτίωσης της γεύσης που αποτελούν προκλήσεις για τα ερευνητικά τμήματα της εν λόγω βιομηχανίας.

Πέρα των παραπάνω εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον σε αυτή των ζωοτροφών που ξεκινάμε τώρα να μελετούμε πειραματικά. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούμε τα υπολείμματα των εκχυλίσεων, το σύνολο των αλγινικών αλάτων, ως σταθεροποιητές pH σε σιτηρέσια μυρηκαστικών. Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά με έτοιμα βιομηχανικά προϊόντα να ξεκινούν την εμπορική τους πορεία.

Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα, πρωτοτυπίες και προοπτικές έρευνας

8.1 Γενικά Συμπεράσματα Διατριβής

Τα μικροφύκη αποτελούν μια πραγματική πηγή πρώτων υλών για την βιομηχανία τροφίμων, ζωοτροφών αλλά και ενέργειας. Η παρούσα διατριβή απέδειξε ότι οι νέες προτεινόμενες πράσινες μέθοδοι εκχύλισης (η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα) που κερδίζουν ολοένα έδαφος στην ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών αλλά και η χρήση πράσινων και φιλικών διαλυτών όπως το MCT και το αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιοποίηση διάφορων εκχυλισμάτων μικροφυκών. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, όπως είναι η μείωση του χρόνου εκχύλισης, η χρήση πράσινων διαλυτών και δη υφιστάμενων συστατικών πολλών τροφίμων, η αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης και η μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος καθώς υπάρχει συρρίκνωση του χρόνου και της ενέργειας εκχύλισης.

Μέσω της διατριβής αυτής αναδείχθηκε η εφαρμογή των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων με υπερήχους και μικροκύματα για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από μικροφύκη και κυρίως καροτενίων, πρωτεϊνών και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ομάδων με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση και ενεργότητα. Σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα αυτών των εκχυλίσεων έδειξε να παίζει η φύση του ιστού που επεξεργάζεται και η θέση των συστατικών μέσα στις διαφορετικές δομές του ιστού, η προ-επεξεργασία του υλικού πριν από την εκχύλιση (ζήρανση, άλεση), το είδος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και τέλος, η φύση των συστατικών προς εκχύλιση.

Οι υποβοηθούμενες μέθοδοι εκχύλισης στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκαν αποδοτικές, καθώς επιτυγχάνεται διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και βελτιώνεται η διείσδυση του διαλύτη στο εσωτερικό του μικροάλγους με συνέπεια βελτιώνεται η εκχύλιση των συστατικών σε αυτόν. Κάθε υλικό ωστόσο, ανάλογα με την προεπεξεργασία στην οποία έχει υποβληθεί και τον διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, παρουσίασε διαφορετικούς ρυθμούς εκχύλισης και μέγιστες αποδόσεις, τα οποία υπολογίστηκαν με διαδοχικά συγκριτικά πειράματα επιλογής.

Τόσο η απόδοση των εκχυλίσεων όσο και η στοχευμένη ανάκτηση των καροτενοειδών και ιδιαίτερα της ασταξανθίνης από τη βιομάζα του φύκου *Haematococcus pluvialis* εξαρτάται ισχυρά από τη φύση του διαλύτη και την τεχνική εκχύλισης. Στην παρούσα εργασία, όσον αφορά στην επιλογή της βέλτιστης τεχνικής εκχύλισης, οι εκχυλίσεις παρουσία υπερήχων, μικροκυμάτων και συνδυασμού υπερήχων και μικροκυμάτων εξετάστηκαν με κριτήριο τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης σε ασταξανθίνη και καροτενοειδή.

Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις παρουσία υπερήχων και από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε ως ένταση υπερήχων τα 648 W ενώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μέγιστη ανάκτηση επιτυγχάνεται μετά τα 20min.

Όσον αφορά στην εκχύλιση με μικροκύματα παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση των καροτενοειδών παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις συγκριτικά με αυτή με υπέρηχους. Η υψηλή συγκέντρωση καροτενοειδών σε σύντομο χρόνο εκχύλισης με μικροκύματα οφείλεται στο γεγονός ότι η στοχευμένη θέρμανση του διαλύτη και της βιομάζας παρουσία μικροκυμάτων επιταχύνει σημαντικά το φαινόμενο της διαβροχής και της διάχυσης των καροτενοειδών από τη βιομάζα στο διαλύτη. Ωστόσο, σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης η παρατηρούμενη μείωση της συγκέντρωσής τους οφείλεται στο γεγονός ότι τα καροτενοειδή που βρίσκονται στο διάλυμα, λόγω της ακτινοβολίας που δέχονται υποβαθμίζονται θερμικά με συνέπεια τη δραστική μείωση τους. Άρα, η εκχύλιση σε χρόνους μεγαλύτερους από 5min δίνει αμφίβολα αποτελέσματα ενώ μπορεί να οδηγήσει και σε μείωση των καροτενοειδών έως και 20%.

Τέλος, στην περίπτωση της συνδυαστικής εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους είχαμε παρόμοια αποτελέσματα, καθώς παρά την θερμοστάτηση του εκχυλίσματος στους 40°C, η ακτινοβολία που προέρχεται από τα μικροκύματα είχε ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των καροτενοειδών σε μεγάλους χρόνους. Όσον αφορά στην εκχύλιση με υπερήχους, παρατηρείται μία σταδιακή αύξηση των καροτενοειδών η οποία σταθεροποιείται σε χρόνο μεγαλύτερο των 20 min και μάλιστα σε τελική συγκέντρωση ελαφρώς υψηλότερη των δύο προηγούμενων μεθόδων στους ίδιους χρόνους επεξεργασίας.

Αναλύοντας όλα τα πειραματικά δεδομένα επιλέχθηκε η εκχύλιση με υπερήχους ως η βέλτιστη τεχνική για την ανάκτηση καροτενοειδών στην οποία εξετάστηκαν κατόπιν

οι επιπλέον παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης δηλαδή, οι διαλύτες, η ένταση των υπερήχων και η αναλογία βιομάζας:διαλύτη. Ως ιδανικός χρόνος εκχύλισης παρουσία υπερήχων επιλέχθηκαν τα 20 min στα οποία επιτεύχθηκε η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών.

Από τα αποτελέσματα ανάκτησης συνολικών καροτενοειδών που περιλαμβάνουν την ασταξανθίνη, παρατηρήθηκε ότι η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή σχετίζεται τόσο με την ισχύ των υπερήχων όσο και με την αναλογία στερεών προς διαλύτη. Αναφορικά με τους διαλύτες εκχύλισης, η ακετόνη παρουσίασε ως περιμέναμε την μέγιστη ανάκτηση, ωστόσο και με τους φυσικούς διαλύτες, έλαιο πορτοκαλιού και MCT, τα αποτελέσματα ήταν εξίσου ικανοποιητικά. Μελετώντας την απόδοση εκχύλισης σε σταθερή ισχύ 648 W, διαπιστώθηκε ότι η μείωση του διαλύτη προκάλεσε μείωση της απόδοσης εκχύλισης καθώς επέρχεται ισορροπία λόγω του φαινομένου της αντίστροφης ώσμωσης. Από τους πράσινους διαλύτες, το D-λιμονένιο ήταν πιο από το έλαιο MCT ενώ είχε και καλύτερη γεύση και άρωμα που το καθιστούν πιο εύχρηστο σε εφαρμογές σε τρόφιμα και ποτά.

Θα σημειώσουμε ότι εκχυλίσσεις που πραγματοποιήθηκαν στα 450 W είχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή σε ποσοστό μέχρι και 20% ενώ η συνολική απόδοση καροτενοειδών δεν επηρεάζεται σημαντικά από την αναλογία στερεού προς διαλύτη κάτι που ερμηνεύεται με την ελαφρά υπερήχηση και τη μερική διάσπαση των κυττάρων που επιτρέπει την διείσδυση των διαλυτών.

Διαπιστώθηκε, ακόμη, ότι αυξάνοντας την ένταση των υπερήχων αυξάνεται και το σύνολο των καροτενοειδών που ανακτάται από τη βιομάζα του φύκου *Haematococcus pluvialis*, γεγονός που ερμηνεύεται καθώς η αύξηση της έντασης των υπερήχων προκαλεί εντονότερη μηχανική καταπόνηση της βιομάζας με συνέπεια να εκχυλίζεται στο διαλύτη μεγαλύτερη ποσότητα καροτενοειδών.

Η φύση του ελαίου πορτοκαλιού (λιμονένιο) καθιστά το εκχύλισμα κατάλληλο για την εφαρμογή του σε προϊόντα χυμών και σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης η εκχύλιση παρουσία υπερήχων με συγκεκριμένα πρωτόκολλα είναι η πλέον αποτελεσματική για την ανάκτηση καροτενοειδών (ασταξανθίνης) και για την επακόλουθη ενσωμάτωση αυτών των εκχυλισμάτων σε προϊόντα τροφίμων με ιδιαίτερη διείσδυση στην κατηγορία των χυμών.

Στις δοκιμές υπερκρίσιμης εκχύλισης διαπιστώθηκε ότι η απόδοση της ασταξανθίνης αυξήθηκε ανάλογα με την πίεση μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή και μετά μειώθηκε. Χαμηλότερη ή υψηλότερη τιμή πίεσης από τα 450 bar οδήγησε σε χαμηλότερη απόδοση σε ασταξανθίνη. Αντίστοιχα η θερμοκρασία είχε παρόμοια επίδραση με την πίεση στην απόδοση και η απόδοση στους 65 °C ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τις άλλες θερμοκρασίες καθώς, η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία μεταξύ της πυκνότητας του ρευστού και της τάσης ατμών της διαλυμένης ουσίας, οι οποίες επηρεάζονται από τη θερμοκρασία και την πίεση.

Ακολούθως στα πειράματα με γαλακτώματα παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στο μικρογαλάκτωμα αυξάνεται έως κάποια χρονική στιγμή και μετά σταθεροποιείται. Την ίδια συμπεριφορά έχει και η απόδοση της εκχύλισης όπου στα 10 min παρουσιάζεται η μέγιστη τιμή της. Με διαδοχικά πειράματα καταλήξαμε ότι μεγαλύτερη αύξηση εκχυλιζόμενων καροτενοειδών παρατηρείται ή μπορεί να συμβαίνει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του γαλακτώματος και του επεξεργαζόμενου φύκους σε αρκετά μεγαλύτερους χρόνους μετά από πέντε ή και έξι ημέρες. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στην απόδοση παίζει η αναλογία βιομάζας:διαλύτη γεγονός που οφείλεται στο σημείο κορεσμού του διαλύτη.

Η εκχύλιση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* και ιδιαίτερα τα ω-3 λιπαρά οξέα στα οποία ανήκει το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) αποτέλεσαν την επόμενη ενότητα πειραμάτων. Η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε πάλι με σύγχρονες μεθόδους εκχύλισης όπως παρουσία Υπερήχων και Μικροκυμάτων, με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και με μικρογαλακτώματα ενώ ως διαλύτες εκχύλισης επιλέχθηκαν τόσο συμβατικοί διαλύτες (αιθανόλη και μεθανόλη) όσο και φυσικοί (MCT και έλαιο πορτοκαλιού).

Όπως και στην περίπτωση του του φύκους *Haematococcus pluvialis*, η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* εξαρτάται εκτός από την τεχνική εκχύλισης και από τη φύση του διαλύτη. Μελετώντας ως παράγοντες βελτιστοποίησης το χρόνο, τους διαλύτες, την αναλογία βιομάζας:διαλύτη και την ένταση εκχύλισης με κριτήριο τη μέγιστη ανάκτηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκαν διάφορες εκχυλίσεις Αυτό που παρατηρείται είναι ότι έως

τα 20min η συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο εκχύλισμα αυξάνεται ενώ σε μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης η συγκέντρωση σταθεροποιείται και συνεπώς αυτός είναι ο ιδανικός χρόνος εκχύλισης.

Από αυτές τις δοκιμές στις αναλογίες βιομάζας:διαλύτη με χρήση τόσο φυσικών (έλαιο πορτοκαλιού, MCT) όσο και συμβατικών (μεθανόλη, αιθανόλη) διαλυτών σε σταθερή τόσο την ένταση των υπερήχων στα 100W όσο και τη διάρκεια εκχύλισης (20 min) παρατηρείται ότι η αυξάνοντας την αναλογία βιομάζας:διαλύτη, η ανάκτηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνεται. Η ίδια τάση εμφανίζεται για όλους τους διαλύτες και το γεγονός αυτό οφείλεται στον γρήγορο κορεσμό των διαλυτών με τη χρήση υψηλών ποσοτήτων βιομάζας. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η μεθανόλη και το έλαιο πορτοκαλιού παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ενώ ακολούθησαν το MCT και τέλος η αιθανόλη.

Στα πειράματα με υποβοηθούμενες συνθήκες εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παρουσία υπερήχων με ένταση 100, 250W αλλά και μικροκυμάτων με ένταση 200, 380W. Με αυτά διαπιστώσαμε ότι, όσον αφορά τους διαλύτες εκχύλισης, η μεθανόλη είναι πιο αποτελεσματική από το έλαιο πορτοκαλιού για την ανάκτηση λιπαρών οξέων τόσο παρουσία υπερήχων όσο και μικροκυμάτων. Ωστόσο, το έλαιο πορτοκαλιού έχει σχετικά καλά αποτελέσματα και μπορεί να αποτελεί μια αξιόλογη εναλλακτική για την ανάκτηση υψηλών ποσοστών σε λιπαρά οξέα έναντι της χρήσης συμβατικών διαλυτών. Το εμπλουτισμένο έλαιο μπορεί τότε να χρησιμοποιείται από την βιομηχανία χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς και χωρίς να αποτελεί εξωτερικό πρόσθετο.

Από τις τεχνικές εκχύλισης, αυτή με την παρουσία υπερήχων εμφάνισε υψηλότερη ανάκτηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συγκριτικά με την εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται στην μερική θερμική υποβάθμιση των λιπαρών οξέων λόγω των μικροκυμάτων. Τέλος, όσον αφορά στην εφαρμογή υπερήχων, παρατηρείται ότι αυξάνοντας την ένταση, η συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνεται στο εκχύλισμα. Συνεπώς, με βάση την παραπάνω παρατήρηση και την ολοκλήρωση των δοκιμών, ως βέλτιστη ένταση υπερήχων για την ανάκτηση των λιπαρών οξέων επιλέγονται τα 100W. Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι από το σύνολο των δοκιμών, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση ελαίου πορτοκαλιού ως διαλύτη, σε αναλογία εκχύλισης 1:10, σε χρόνο εκχύλισης 20 min παρουσίασαν ικανοποιητική απόδοση σε πολυακόρεστα

λιπαρά οξέα εκείνα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία υπερήχων στα 100W. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων αναλύθηκαν και βρέθηκαν ως στην αρχική τους κατάσταση εντός του διατόμου χωρίς καμία υποβάθμιση.

Επίσης, με την υπερκρίσιμη εκχύλιση η απόδοση είναι λίγο υψηλότερη όταν η πίεση λειτουργίας είναι 600bar αλλά μεγάλος χρόνος εκχύλισης (7h), ενώ και σε πίεση λειτουργίας 800bar επιτυγχάνεται ικανοποιητική απόδοση σε συντομότερο χρόνο εκχύλισης (5h). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα αυξάνεται με την αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται και η ανάκτηση του εκχυλίσματος. Αναλύοντας την σύσταση των λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* ως συνάρτηση των συνθηκών εκχύλισης (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων), τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το κύριο λιπαρό οξύ το οποίο ανακτάται από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* είναι το EPA, η σύσταση του οποίου φτάνει έως και 32.8% επί του συνόλου των λιπαρών οξέων.

Με δεδομένο ότι τα μικράλγη είναι ευπαθείς μικροοργανισμοί θα πρέπει γρήγορα να σταθεροποιηθούν με την ξήρανση να μοιάζει ίσως μοναδική λύση. Έτσι, κάναμε αρκετές δοκιμές προκατεργασίας με την ξήρανση. Η ξήρανση με ψεκασμό και λυοφιλίωση μοιάζουν να έχουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά και αναμένεται να δώσει και λιγότερα έντονα αρώματα..

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης έγιναν εφαρμογές των προϊόντων μικροφυκών στη βιομηχανία τροφίμων σε δύο εφαρμογές. Στην πρώτη περίπτωση έγινε δοκιμή αντικατάστασης πρωτεΐνης και λιπαρών σε αρτοσκεύασμα μπριός από προϊόντα εκχύλισης από το μικροάλγος *Chlorella vulgaris*. Από τις φυσικοχημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις των τελικών δειγμάτων προκύπτει ότι μπορεί να γίνει πλήρη υποκατάσταση των ζωικών λιπαρών και πρωτεϊνών στην συνταγή του αρτοσκευάσματος τύπου μπριός από αυτά που παράγονται και εκχυλίζονται από το μικροάλγος *Chlorella vulgaris*. Το τελικό προϊόν ήταν πλήρως αποδεκτό στην οργανοληπτική ανάλυση συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων γεύσης, οσμής, χρώματος, δομής και υφής και σε σύγκριση με το προϊόν αναφοράς της αγοράς. Προφανώς απαιτούνται σύνθετες προκατεργασίες στα εκχυλιζόμενα πρόσθετα για να εξαλειφθούν τυχόν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις. Επιπλέον το νέο προϊόν με την προσθήκη των Ω3 λιπαρών μαζί με τα λοιπά αντιοξειδωτικά από το εκχύλισμα του

μικροφύκους, αποκτά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, μια αίσθηση φρεσκότητας για περισσότερο χρόνο αλλά και μια «καθαρότερη» ετικέτα με λειτουργικές αναφορές.

Στη δεύτερη εφαρμογή, εκχυλίσματα καροτενοειδών (ασταξανθίνης) αλλά και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προστέθηκαν σε χυμούς φρούτων με σκοπό αφενός να προσδώσουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής αλλά και λειτουργικό χαρακτήρα στο τελικό προϊόν. Εδώ οι προκλήσεις είναι μεγαλύτερες καθώς θα πρέπει να αντιμετωπιστεί το ζήτημα της οργανοληπτικής επίδρασης των εκχυλισμάτων στα τελικά προϊόντα που έχουν τελείως διαφορετικό προφίλ.

Με τη συνεργασία του ερευνητικού τμήματος της Ασπίς έγιναν κατάλληλες προκατεργασίες ώστε τα βιοδραστικά συστατικά να ενσωματωθούν στα προϊόντα με ικανοποιητικό βαθμό αποδεκτότητας. Οι φυσικοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι το εκχύλισμα ασταξανθίνης δημιουργεί ένα πιο ανθεκτικό σύστημα στην οξειδωση από την πάροδο του χρόνου ενώ τα προϊόντα είναι γενικά οργανοληπτικά αποδεκτά σε σχέση με τα υφιστάμενα εμπορικά. Επίσης, τόσο για την ασταξανθίνη όσο και για τα λιπαρά οξέα δημιουργήθηκαν πρώτα γαλακτώματα, με παράγοντες ουδετεροποίησης του αρώματος, που μπορούν να ενσωματωθούν σε υδατικό διάλυμα χωρίς να γίνει διαχωρισμός.

Ωστόσο στην περίπτωση της προσθήκης Ω3 λιπαρών οξέων επιβάλλεται μείωση του χρόνου ζωής στα προϊόντα καθώς προκύπτει επαναφορά αμυδρού γευστικού τόνου ιχθύος που αντιλαμβάνονταν οι δοκιμαστές μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Με τη μελέτη μας φαίνεται ότι είναι εφικτή η εφαρμογή των εκχυλισμάτων μικροφυκών στη βιομηχανία χυμών με δυνατότητα παραγωγής ιδιαίτερων προϊόντων και μάλιστα με διατροφικούς ισχυρισμούς. Η χρήση μεγάλων ποσοστών τέτοιων εκχυλισμάτων χωρίς να προηγηθούν ειδικές προεπεξεργασίες είναι σχεδόν αδύνατη και οι τρόποι σταθεροποίησης, απόσμησης και βελτίωσης της γεύσης αποτελούν προκλήσεις για νέες έρευνες.

Πέρα των παραπάνω εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον σε αυτή των ζωοτροφών που ξεκινάμε τώρα μελετούμε πειραματικά. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούμε τα υπολείμματα των εκχυλίσεων, το σύνολο των αλγινικών αλάτων, ως σταθεροποιητές pH στα σιτηρέσια των μυρμηκαστικών. Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά με εμπορικά προϊόντα να έχουν ήδη ξεκινήσει.

8.2 Προοπτικές Έρευνας

Για μελλοντική επέκταση της παρούσας διατριβής προτείνεται να εξετασθούν τα ακόλουθα ερευνητικά αντικείμενα:

1. Εξέταση, ανάπτυξη και σύγκριση της υψηλής απόδοσης των πράσινων διεργασιών εκχύλισης και σε άλλα μικράλγη. Μελέτη της βιομηχανικής εφαρμογής τους εξετάζοντας παράλληλα την αποδοτικότητα και την περιβαλλοντική τους επίδοση.
2. Εξέταση πολλαπλών πρώτων υλών με ενδιαφέρον βιοδραστικό φορτίο, όπως μικροάλγη με φαρμακευτικό ενδιαφέρον.
3. Μελέτη της επίδρασης της διακύμανσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μικροφυκών σε διάφορες συνθήκες και στάδια ανάπτυξης στις αποδόσεις και στην εκλεκτικότητα των εξεταζόμενων μεθόδων και γραμμών εκχύλισης.
4. Μελέτη πολλαπλών μεθόδων προεπεξεργασίας τόσο για τη διατηρησιμότητα όσο και για την μέγιστη ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων από τα μικροφύκη
5. Μελέτη των συνθηκών καλλιέργειας και επεξεργασία που αποδίδουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο προϊόν στόχο.
6. Εξέταση διαφορετικών συστημάτων διαλυτών για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών και προσδιορισμός του περιβαλλοντικού τους αποτυπώματος μέσω της ανάλυσης κύκλου ζωής.
7. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των βιοδραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων με πολλαπλές μεθόδους ανάλυσης (φασματοφωτομετρικές, HPLC, NMR, FTIR) αναζητώντας τον καλύτερο και συντομότερο τρόπο ελέγχου των δειγμάτων.
8. Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση των γραμμών εκχύλισης μελετώντας πολλαπλά σημεία σχεδιασμού όπως οι συνθήκες συντήρησης, προεπεξεργασία, μέγεθος κόκκων υλικού, αναλογία στερεού διαλύτη, θερμοκρασία, χρόνος επεξεργασίας, αναλογία συστήματος διαλυτών, ένταση μικροκυματικής ακτινοβολίας ή υπερήχων, κ.α., εφαρμόζοντας μαθηματικά μοντέλα μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης.

9. Ανάπτυξη και άλλων τελικών προϊόντων τροφίμων ή καλλυντικών στα όποια θα περιέχονται φυσικά εκχυλίσματα προερχόμενα με τις προτεινόμενες πράσινες μεθόδους εκχύλισης. Μελέτη της λειτουργικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των εκχυλισμάτων σε διάφορα συστήματα προϊόντων.

10. Μελέτη της εφαρμογής και της χρήσης των υπολειμμάτων των εκχυλίσεων. Εργαζόμαστε σήμερα με σημαντικό ενδιαφέρον στον κλάδο των ζωοτροφών που τώρα μελετούμε πειραματικά να χρησιμοποιούμε τα υπολείμματα των εκχυλίσεων, το σύνολο των αλγινικών αλάτων, ως σταθεροποιητές pH στα σιτηρέσια των μυρμηκαστικών. Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα και δημιουργούνται ήδη εμπορικά προϊόντα.

11. Μελέτη της διάρκειας ζωής των εκχυλισμάτων τόσο μικροβιακά όσο και ως προς τη διατήρηση της βιοδραστικότητας τους ως προς το χρόνο. Αξιολόγηση των διαφορών μορφών των εκχυλισμάτων (υδατικό, ξηρό, ελαιώδες, κτλ).

12. Μελέτη εναλλακτικής αξιοποίησης των υπολειμμάτων της εκχύλισης σε μονάδες κομποστοποίησης και βιοδιύλισης, ώστε να μειωθεί σημαντικά ο όγκος των υπολειμμάτων και να μην προκαλείται πρόβλημα με τη διαχείρισή τους.

13. Μελέτη οικονομικής βιωσιμότητας με βάση τόσο το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των γραμμών παραγωγής όσο και την ποιότητα των τελικών εκχυλισμάτων, καθώς στοχευμένη εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες δίνει καθαρό εκχύλισμα προς χρήση και εφαρμογή χωρίς άλλο στάδιο με ελάχιστο περιβαλλοντικό αντίκτυπο.

14. Ακριβής σχεδιασμός της μονάδας παραγωγής και αξιοποίησης μικροφυκών στην Ελλάδα με επιλογή κατάλληλου σημείου εγκατάστασης, στοχεύοντας επίσης στη βελτιστοποίηση της διακίνησης πρώτων υλών και προϊόντων και την αγορά στην οποία θα απευθύνονται.

15. Μελέτη αξιοποίησης μικροφυκών αλμυρού νερού σε συνδυασμό με ιχθυοκαλλιέργειες παράγοντας ταυτόχρονα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

16. Χρήση των μικροφυκών ως δεσμευτικά διοξειδίου του άνθρακα

Βιβλιογραφία

1. Socaciu, C. (Ed.). (2007). "Food Colorants: Chemical and Functional Properties (1st ed.)". CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420009286>
2. Gultekin F, Dofuc D, "Allergie and Immunologie Reactions to Food Additives", Clinic Rev. Aelleg. Immunol, 2012
3. Weiss JA, Cappadocia MC, MacMullin JA, Viecili M, Lunsy Y., "The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment". Autism. 2012, 16(3):261-74. doi: 10.1177/1362361311422708. Epub 2012 Feb 1. PMID: 22297202.
4. Joel T. Nigg, Kara Lewis, Tracy Edinger, Michael Falk, "Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives", Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, Volume 51, Issue 1, 2012, Pages 86-97.e8, ISSN 0890-8567, <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2011.10.015>.
5. Randhawa, Shahid; Bahna, Sami L. Hypersensitivity reactions to food additives. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. p278-283, 2009, DOI: 10.1097/ACI.0b013e32832b2632
6. Ambati, R.R., Moi, P.S., Ravi, S., Aswathanarayana, R.G., 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. Mar. Drugs. doi:10.3390/md12010128
7. Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P., 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. TrAC Trends Anal. Chem. 56, 49–73. doi:10.1016/j.trac.2013.12.011
8. Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.), in: Aquaculture. pp. 309–323. doi:10.1016/S0044-8486(03)00298-9
9. Göksan, T., Ak, I., Kılıç, C., 2011. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 11, 377–383. doi:10.4194/1303-2712-v11
10. Hamilton, E.I., 1984. A manual of chemical & biological methods for seawater analysis. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/0025-326X(84)90262-5
11. Nagaraja, S., Arulmurugan, P., Rajaram, M., Sundararaj, R., Rengasamy, R., 2012. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. Phytos 42, 59–71. doi:2011.03.031.
12. Rostagno, M. a., Palma, M., Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. J. Chromatogr. A 1012, 119–128. doi:10.1016/S0021-9673(03)01184-1
13. Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. J. Am. Coll. Nutr. 21, 495–505. doi:10.1080/07315724.2002.10719248
14. Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A., 2008. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresour. Technol. 99, 3110–3115. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.062

15. Ward, O.P., Singh, A., 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627–3652. doi:10.1016/j.procbio.2005.02.020
16. M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonalda, K. Robards. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, Issue 1, 2002
17. Pokorny, J.P. Are Natural Antioxidants Better and Safer Than Synthetic Antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 629-642, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700064>
18. T. Ballard. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins. Thesis for Doctor of Philosophy in Biological Systems Engineering, submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008
19. M. Ding, J. Zou. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chemistry* Volume 131, Issue 3, 1 April 2012, Pages 1051-1055, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.100>
20. T. Umemura, Y. Kodama, K. Hioki, T. Inoue, T. Nomura, Y. Kurokawa. Butylhydroxytoluene (BHT) increases susceptibility of transgenic rasH2 mice to lung carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* volume 127, pages583–590 (2001)
21. Ito N., Hirose M., Kurata Y., Ikawa E., Mera Y., Fukushima S. Induction of forestomach hyperplasia by crude butylated hydroxyanisole, a mixture of 3-tert and-2-tertisomers in Syrian golden hamsters is due to 3-tert-butylated hydroxyanisole. *Gann*, 1984; 75: 471
22. J. Sebranek; V. Sewalt; K. Robbins; T Houser. Antioxidant Effectiveness of NaturalRosemary Extract in Pork Sausage. *Animal Industry Report: AS 650, ASL R1852*. Available at: http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol650/iss1/11
23. A. Augustaniak, G. Bartozs, A. Cipak, G. Duburs, L. U. H. Á Kov, W. Ł. Uczaj, M. Majekova, A. D. Odysseos, L. Rackova, E. Z. Bieta Skrydlewska, M. Stefek, M.S. Trosov, G. Tirzitis, P. Rimantas Veskutonis, J. Viskupicova, P.S. Vranka, N.Z. Arkovic. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview *Free Radical Research*. 2010; 44(10): 1216–1262
24. S. Khurana, K. Venkataraman, A. Hollingsworth, M. Piche, T. C. Tai. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging Nutrients. 2013, 5, 3779-3827; doi:10.3390/nu5103779
25. M. Quiñones, M. Miguel, A. Aleixandre. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2013 Feb;68(1):125-31, doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.018.
26. Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2013
27. S.K. Kim, H. Kim, S.A. Kim, H. K. Park., W. Kim. Anti-Inflammatory and Anti-Superbacterial Activity of Polyphenols Isolated from Black Raspberry. *Korean J Physiol Pharmacol* Vol 17: 73 –79, February, 2013 <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.1.73>
28. J.A. Nichols, S.K. Katiyar. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 2010 March; 302(2): 71. doi:10.1007/s00403-009-1001-3

29. B. L. Queen, T. O. Tollefsbol. Polyphenols and Aging. *Curr Aging Sci.* 2010 February ; 3(1): 34–42
30. O. Weinreb, S. Mandel, T. Amit, M. B H Youdim. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Nutr Biochem.* 2004 Sep;15(9):506-16, doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.05.002.
31. Y. Ding, H. Yao, Y. Yao, L. Y. Fai, Z. Zhang. Protection of Dietary Polyphenols against Oral Cancer, *Nutrients*, 2013, 5, 2173-2191; doi:10.3390/nu5062173
32. M. Fantini, M. Benvenuto, L. Masuelli, G. Vanni Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti, R. Bei. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 9236-9282; doi:10.3390/ijms16059236
33. Chung S. Yang Joshua D. Lambert, Shengmin Sang, Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols, *Arch Toxicol.* 2009, 83(1): 11. doi:10.1007/s00204-008-0372-0
34. McDonald et al., 1996 Mark McDonald, Isabelle Mila, and Augustin Scalbert. Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation, *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 599–606
35. K.W. Ong, A. Hsu, L. Song, D. Huang, B.K.H. Tan. Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (2) (2011), pp. 598-607, 10.1016/j.jep.2010.10.046
36. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2017, Article ID 8416763, <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
37. G. Kennedy, V. A. Spence, M. McLaren, A. Hill, C. Underwood, J, J.F Belch Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms, *Free Radical Biology and Medicine* Volume 39, Issue 5, 1 September 2005, Pages 584-589
38. Eun-Sun Hwang, Gun-Hee Kim, Effects of various heating methods on glucosinolate, carotenoid and tocopherol concentrations in broccoli, *Int J Food Sci Nutr.*, 2013, 64(1):103-11. doi: 10.3109/09637486.2012.704904.
39. Carlsen M. H., Halvorsen B. L., Holte K., 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide, *Nutrition Journal*, 9, 3.
40. Skibsted LH, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 , 2409–2417.
41. R.-B. Volk, A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction, *Microbiological Research*, vol. 163, no. 2, pp. 161-167, 2008.
42. Papadaki S., Kyriakopoulou K., Krokida M., 2016, Recovery and Encapsulation of Bioactive Extracts from *Haematococcus Pluvialis* and *Phaedodactylum Tricornutum* for food Applications, *IOSR Journal of Environmental Science*, 10(12), 2319–2399
43. Shimidzu N., Goto M., Miki, W., 1996, Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms, *Fisheries science*, 62(1), 134–137.

44. Zhang Z., Wang B., Hu Q., 2016, A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 113(10), 2088–2099.
45. Elbahnaswy, S., Elshopakey, G.E. Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: a review. *Fish Physiol Biochem* (2023). <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01167-0>
46. Cuellar-Bermudez S. P., Hernandez I. A., Cardenas- Chavez D., 2015, Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins, *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190-209.
47. Kang C.D., Sim S.J., 2008, Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils, *Biotechnology Letters*, 30(3), 441–444.
48. Panis G., Carreon J.R., 2016, Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line, *Algal Research*, 18, 175-190
49. Wan M., Zhang J., Hou D., 2014, The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation, *Bioresource Technology*, 167, 276-283
50. Gao, Z., Meng C., Chen Y. C., 2015, Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress, *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1853–1860.
51. Borowitzka M. A., 2013, High-value products from microalgae-their development and commercialization, *Journal of Applied Phycology*, 25, 743–756.
52. Chekanov, K. , Lobakova E., Selyakh I., 2014, Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia), *Marine Drugs*, 12(8), 4504–4520
53. Yecong Li, Wenguang Zhou, Bing Hu, Min Min, Paul Chen, Roger R. Ruan, Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors, *Bioresource Technology* 102 (2011) 10861–10867, 2011
54. 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), 64–70.
55. Sontaya Krichnavaruk a, Artiwan Shotipruk a, Motonobu Goto b, Prasert Pavasant, Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent, *Bioresource Technology* Volume 99, Issue 13, September 2008, Pages 5556-5560
56. Zou T.B., Jia Q., Li H.W., 2013, Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Marine Drugs*, 11(5), 1644–1655.
57. Mason T., Chemat F., Vinatoru M., 2011, The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves, *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247.
58. European Parliament Council, 2008;

59. The European Parliament And The Council Of The European Union, 2009
60. Sun J., 2007, 'D-Limonene : D-Limonene, *Alternative Medicine*, 12(3), 259–264
61. Golmakani M. T., Mendiola J.A., Rezaei K., 2014, Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms, *Journal of Supercritical Fluids*, 92, 1–7
62. St-Onge, M.-P., Bosarge A., Goree L.L.T., 2008, Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil, *Journal of the American College of Nutrition*, 27(5), 547–52
63. Raposo M. F. de J., de Morais A. M. M. B., de Morais R. M. S. C., 2015, Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases, *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(8), 5128–55.
64. Raposo M. F. J., Morais A. M. M. B., Morais R. M. S. C., 2012, Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1253–1257
65. Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiovasc Med. (Hagerstown)*. 2007; 8 Suppl 1:S27-29.
66. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999; 354:447-55.
67. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007; 369:1090-98.
68. Willett WC. The role of dietary n-6 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *J Cardiovasc Med. (Hagerstown)*. 2007; 8 Suppl 1:S42-5.
69. Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2005; 111:157-64.
70. D. Patras, C.V. Moraru, C. Socaciu, Screening of Bioactive Compounds synthesized by microalgae: A progress overview on extraction and chemical analysis *UBB CHEMIA, LXIII, 1, 2018 (p. 21-35) DOI:10.24193/subbchem.2018.1.02*
71. Kiran, B.R.; Venkata Mohan, S. Microalgal Cell Biofactory—Therapeutic, Nutraceutical and Functional Food Applications. *Plants* 2021, 10, 836. <https://doi.org/10.3390/plants10050836>
72. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Michaud DS, et al. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80:204-16.
73. Koralek DO, Peters U, Andriole G, et al. A prospective study of dietary alpha-linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control*. 2006; 17:783-91
74. Eilander A, Hundscheid DC, Osendarp SJ, Transler C, Zock PL. Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007; 76:189-203.
75. Oken E, Kleinman KP, Berland WE, Simon SR, Rich-Edwards JW, Gillman MW. Decline in fish consumption among pregnant women after a national mercury advisory. *Obstet Gynecol*. 2003; 102:346-51
76. Insenmann et al, *Journal of the International Society of Sport Nutrition*, 61/2020

77. WAM Blom, et al, European Journal of Nutrition, June 2019, vol58, issue 4, pp1615-1624, doi 10.1007/s00394-018-1706-1
78. Arif Rahman et al, AIP Con Proc 2062,020059-1
79. Venkata Mohan, S.; Rohit, M.V.; Chiranjeevi, P.; Hariprasad, R.; Arora, S. Integrating microalgae cultivation with wastewater treatment for biodiesel production. In *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 321–337
80. Arif Rahman, Nining Betawati Prihantini, and Nasruddin Fatty acid of microalgae as a potential feedstock for biodiesel production in Indonesia Cite as: AIP Conference Proceedings 2062, 020059 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5086606> Published Online: 25 January 2019
81. Rajvanshi, S. and M.P. Sharma, Micro algae: a potential source of biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 2012. 2(3): p. 49.
82. Sajjadi, B., et al., Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018. 97: p. 200-232
83. Amjad Khan W, Chun-Mei H, Khan N, Iqbal A, Lyu SW, Shah F. Bioengineered Plants Can Be a Useful Source of Omega-3 Fatty Acids. *Biomed Res Int*. 2017, doi: 10.1155/2017/7348919
84. Zhi-You Wen, Feng Chen, Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae, *Biotechnology Advances*, Volume 21, Issue 4, 2003, Pages 273-294, ISSN 0734-9750, [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X).
85. Dimitra Karageorgou, Ulrika Rova, Paul Christakopoulos, Petros Katapodis, Leonidas Matsakas, Alok Patel, Benefits of supplementation with microbial omega-3 fatty acids on human health and the current market scenario for fish-free omega-3 fatty acid, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 136, 2023, Pages 169-180, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.018>
86. Elena Ibañez , Miguel Herrero , Jose A. Mendiola , and María Castro-Puyana Bioactivity and Food Analysis Department , Institute of Food Science Research (CIAL-CSIC), Nicolás Cabrera 9 Campus UAM Cantoblanco , Madrid 28049 , Spain
87. Bellisle et al., 1998, F. Bellisle^{1*}, J. E. Blundell², L. Dye², M. Fantino³, E. Fern⁴, R. J. Fletcher¹, J. Lamb⁵, M. Roberfroid⁷, S. Specter¹, J. Westenhofer¹ and M. S . Westerterp-Plantenga (17) (PDF) *Functional food science and behaviour and psychological functions. Functional food science and behaviour and psychological functions* *British Journal of Nutrition* (1998), 80, Suppl. 1, S173-S193
88. Diplock et al., 1999 *Scientific Concepts of Functional Foods in Europe – Consensus Document 01/01/1999*
89. Stván G. Télessy, in *The Role of Functional Food Security in Global Health*, 2019
90. J.A. Tur, M.M. Bibiloni, in *Encyclopedia of Food and Health*, 2016
91. Saleh Mobin^{*}, Firoz Alam Some promising microalgal species for commercial applications: A review ICEP2016, 14-16 December 2016, RMIT University, Melbourne, Australia
- 92 Apurav Krishna Koyandea, Kit Wayne Chewa, Krishnamoorthy Rambabub, Yang Taoc,Dinh-Toi Chud,e, Pau-Loke Showa *Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans*, *Food Science and Human Wellness* 8 (2019) 16–24
- 93 Varfolomeev SD, Wasserman LA. Microalgae as source of biofuel, food, fodder and medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2011; 47: 789-807

- 94 Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65:635–648
95. Michele Greque deMorais,¹ Bruna da SilvaVaz,¹ Etiele Greque de Morais,² and Jorge Alberto Vieira Costa² Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 835761, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/835761>
96. R.-B. Volk and F. H. Furkert, “Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth,” *Microbiological Research*, vol. 161, no. 2, pp. 180-186, 2006.
- 97 R.-B. Volk, “A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction,” *Microbiological Research*, vol. 163, no. 2, pp. 161–167, 2008.
- 98 D. F. Smee, K. W. Bailey, M.-H. Wong et al., “Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N,” *Antiviral Research*, vol. 80, no. 3, pp. 266-271, 2008.
99. E. Ibañez and A. Cifuentes, “Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, no. 4, pp. 703-709, 2013
100. G. Markou and E. Nerantzis, “Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 8, pp. 1532-1542, 2013
101. R.Harun, M. Singh, G. M. Forde, andM. K. Danquah, “Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 3, pp. 1037-1047, 2010
102. C. Kolympiris, N. Kalaitzandonakes, and D. Miller, “Public funds and local biotechnology firm creation,” *Research Policy*, vol. 43, no. 1, pp. 121-137, 2014
103. S. Bhagavathy, P. Sumathi, and I. Jancy Sherene Bell, “Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity,” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 1, no. 1, pp. S1-S7, 2011.
104. A. M. F. Palavra, J. P. Coelho, J. G. Barroso et al., “Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 60, pp. 21-27, 2011
105. I. Priyadarshani and B. Rath, “Commercial and industrial applications of micro algae—a review,” *Journal of Algal Biomass Utilization*, vol. 3, no. 4, pp. 89-100, 2012.
106. J. W. Blunt, B.R. Copp, M. H. G. Munro, P.T. Northcote, and M.R. Prinsep, “Marine natural products,” *Natural Product Reports*, vol. 23, no. 1, pp. 26-78, 2006
- 107 A. M. S. Mayer and M. T. Hamann, “Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous

mechanisms of action,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 140, no. 3-4, pp. 265-286, 2005

108. M. Plaza, S. Santoyo, L. Jaime et al., “Screening for bioactive compounds from algae,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, no. 2, pp. 450-455, 2010.

109. I. Rodriguez-Meizoso, L. Jaime, S. Santoyo et al., “Pressurized fluid extraction of bioactive compounds from *Phormidium* species,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 10, pp. 3517-3523, 2008.

110. L. R. Carvalho, A. Costa-Neves, G. A. A. Conserva et al., “Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: in vivo and in vitro aspects,” *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 23, no. 3, pp. 471-480, 2013.

111. B. Nobre, F. Marcelo, R. Passos et al., “Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*,” *European Food Research and Technology*, vol. 223, no. 6, pp. 787-790, 2006

112. R. L. Mendes, A. D. Reis, and A. F. Palavra, “Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: comparison with organic solvent extraction,” *Food Chemistry*, vol. 99, no. 1, pp. 57-63, 2006.

113. R. Sathasivam Ramalingam Radhakrishnan, Abeer Hashem, Elsayed F. Abd-Allah. / *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (2019) 709–722

114. J. A. C. Costa and M. G. Morais, “Microalgae for food production,” in *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*, C. R. Soccol, A. Pandey, and C. Larroche, Eds., p. 486, Taylor & Francis, 2013

115. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in Chlorophyceae species Juan Roberto Benavente-Valdésa, Cristóbal Aguilera, Juan Carlos Contreras-Esquivela, Alejandro Méndez-Zavalab, Julio Montañezb,*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>

116. Y. Li, M. Horsman, B. Wang, N. Wu, C.Q. Lan, Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 629–636.

117. S.H. Ho, C.Y. Chen, J.S. Chang, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae *Scenedesmus obliquus* CNW-N, *Bioresour. Technol.* 113 (2012).

118. Shunni Zhu Wei Huang Jin Xu Zhongming Wang Jingliang Xu Zhenhong Yuan Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>

119. J. Talukdar, M.C. Mohan-Chandra-Kalita, B.C. Goswami, Effects of salinity on growth and total lipid content of the biofuel potential microalga *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs, *Int. J. Sci. Eng. Res.* 3 (2012).

120. Curtis Adams Valerie Godfrey Brad Wahlen Lance Seefeldt Bruce Bugbee, Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.143>

121. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species Juan Roberto Benavente-Valdés, Cristóbal Aguilera, Juan Carlos Contreras-Esquivela, Alejandro Méndez-Zavalab, Julio Montañez, 2016
122. Z.Y. Liu, G.C. Wang, B.C. Zhou, Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4717–4722.
123. A.R. Rao, C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala, G.A. Ravishankar, Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 560–564.
124. V. Ördög, W. Stirk, P. Bálint, J. Staden, C. Lovász, Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 907–914.
125. J.R. Benavente-Valdés, Análisis de factores de estrés sobre la producción de pigmentos por *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor airlift tipo flat panel, Master Thesis, University of Coahuila, 2013.
126. Del-Campo, J.A., Garcia-Gonzalez, M., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 1163–1174
127. Takaichi, S., 2011. Carotenoids in Algae: distributions Biosynthesis and Functions. *Mar. Drugs* 9 (6), 1101–1118.
128. Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 60–78
129. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2), 87–96.
130. H.-B. Li, K.-W. Cheng, C.-C. Wong, K.-W. Fan, F. Chen, and Y. Jiang, “Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae,” *Food Chemistry*, vol. 102, no. 3, pp. 771-776, 2007.
131. T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Microalgae for biodiesel production and other applications: a review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 217- 232, 2010.
132. A. Gupta and J. K. Sainis, “Isolation of C-phycoerythrin from *Synechococcus* sp., (*Anacystis nidulans* BD1),” *Journal of Applied Phycology*, vol. 22, no. 3, pp. 231-233, 2010
133. P. J. Viskari and C. L. Colyer, “Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples,” *Analytical Biochemistry*, vol. 319, no. 2, pp. 263-271, 2003
134. R. Bermejo Román, J. M. Álvarez-Pez, F. G. Acien Fernández, and E. Molina Grima, “Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*,” *Journal of Biotechnology*, vol. 93, no. 1, pp. 73-85, 2002.
135. C. I. Cazzonelli, “Carotenoids in nature: insights from plants and beyond,” *Functional Plant Biology*, vol. 38, no. 11, pp. 833-847, 2011.
136. M. A. Hejazi and R.H. Wijffels, “Milking of microalgae,” *Trends in Biotechnology*, vol. 22, no. 4, pp. 189-194, 2004

137. S. Arad and O. Levy-Ontman, "Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 21, no. 3, pp. 358-364, 2010
138. M. Kim, J. H. Yim, S.-Y. Kim et al., "In vitro inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03," *Antiviral Research*, vol. 93, no. 2, pp. 253-259, 2012
139. Z. A. Mohamed, "Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem," *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 6, pp. 504-516, 2008.
140. T. Tannin-Spitz, M. Bergman, D. Van-Moppes, S. Grossman, and S. Arad, "Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp.," *Journal of Applied Phycology*, vol. 17, no. 3, pp. 215-222, 2005
141. Chen, B.H., Chuang, J.R., Lin, J.H., Chiu, C.P., 1993. Quantification of pro-vitamin A compounds in Chinese vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Food. Prot.* 56 (1), 51-54
142. Henley, W.J., Major, K.M., Hironaka, J.L., 2002. Responses to salinity and heat stresses in two halotolerant Chlorophyte algae. *J. Phycol.* 38, 757-766
143. Raja, R., Anbazhagan, C., Lakshmi, D., Rengasamy, R., 2004. Nutritional studies on *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) under laboratory conditions. *Seaweed Res. Utili.* 26, 127-146
144. Sathasivam, R., Kermanee, P., Roytrakul, S., Juntawong, N., 2012. Isolation and molecular identification of b-carotene producing strains of *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil* from salt soil samples by using species-specific primers and internal transcribed spacer (ITS) primers. *Afr. J. Biotechnol.* 11 (34), 8425-8432
145. Sathasivam, R., Juntawong, N., 2013. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int. J. Curr. Sci.* 5, 67-73
146. Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 25, 743-756
147. Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, N., Sridhar, S., Rengasamy, R., 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34, 77-88
148. Borowitzka, M.A., Huisman, J.M., 1993. The ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales)-effect of environmental conditions on aplanospore formation. *Bot. Mar.* 36, 233-43
149. García, M., Moreno, J., Manzano, J.C., Florencio, F.J., Guerrero, M.G., 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-b-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 115, 81-90.
150. Leon, R., Martin, M., Vigar, J., Vilchez, C., Vega, J.M., 2003. Microalgae mediated photoproduction of b-carotene in aqueous-organic two phase systems. *Biomol. Eng.* 20, 177-182
151. Shaish, A., Harari, A., Kamari, Y., Cohen, H., Schonfeld, G., Harats, D., 2009. Application of *Dunaliella* in atherosclerosis. In: Ben-Amotz, A., Polle, J.E.W., Rao, D.V.S. (Eds.), *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Jersey Science Publishers, USA, pp. 475-494.
152. Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G., Thomas, W.H., 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21, 72-81

153. Heinrich, U., Gartner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., Stahl, W., 2003. Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J. Nutr.* 133, 98–101
154. Phang, S.M., Chu, W.L., Wong, C.Y., Teoh, M.L., Tan, K.P., Lee, H.K., 2007. A checklist of microalgal isolates from Ny Alesund, Svalbard. *Polarnet Technical Report: The Journal of the CNR's Network of Polar Research, 8th Ny Alesund Seminar, Cambridge, UK*, pp. 1–14.
155. Plaza, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae and microalgae. *Trends in Food Science and Technology* 19: 31-39.
156. Merichel Plaza 1, Miguel Herrero, Alejandro Cifuentes, Elena Ibáñez Innovative natural functional ingredients from microalgae Affiliations expand PMID: 19650628 DOI: 10.1021/jf901070g
157. Kadam, S.U. and Prabhasankar, P., “Marine Foods as Functional Ingredients in Bakery and Pasta Products”, *Food Research International*, 2010, 43, 1975-1980. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.007>
158. Kim, S.K. and Wijesekara, I., “Development and Biological Activities of Marine-Derived Bioactive Peptides: A Review”, *Journal of Functional Foods*, 2010, 2, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
159. N. K. Kilic, K. Erdem, G. Donmez., “Bioactive Compounds Produced by *Dunaliella* species, Antimicrobial Effects and Optimization of the Efficiency”, 2017 *Turk. J. Fish. & Aquat. Sci.* 19(11), 923-933 http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_11_04
160. Bilal, M.; Rasheed, T.; Iqbal, H.M.N.; Hu, H.; Wang, W.; Zhang, X. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 103, 554–574.
161. Gustafson, K.R.; Cardellina, J.H.; Fuller, R.W.; Weislow, O.S.; Kiser, R.F.; Snader, K.M.; Patterson, G.M.L.; Boyd, M.R. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 81, 1254–1258
162. Singh, S.; Kate, B.N.; Banerjee, U.C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2005, 25, 73–95
163. Yang, F.; Bewley, C.A.; Louis, J.M.; Gustafson, K.R.; Boyd, M.R.; Gronenborn, A.M.; Wlodawer, A. Crystal structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein, shows unexpected domain swapping 1. *J. Mol. Biol.* 1999, 288, 403–412
164. Hayashi, K.; Hayashi, T.; Kojima, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1996, 12, 1463–1471
165. Hayashi, T.; Hayashi, K.; Maeda, M.; Kojima, I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.*, 1996, 59, 83–87
166. Ayehunie, S.; Belay, A.; Baba, T.W.; Ruprecht, R.M. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1998, 18, 7–12.
167. Dey, B.; Lerner, D.L.; Lusso, P.; Boyd, M.R.; Elder, J.H.; Berger, E.A. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J. Virol.*, 2000, 74, 4562–4569

168. Huleihel, M.; Ishanu, V.; Tal, J.; Arad, S.M. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *J. Appl. Phycol.*, 2001, 13, 127–134
169. Juan Eduardo Sosa-Hernández, Zamantha Escobedo-Avellaneda, Hafiz M. N. Iqbal and Jorge Welti-Chanes State-of-the-Art Extraction Methodologies for Bioactive Compounds from Algal Biome to Meet Bio-Economy Challenges and Opportunities, MDPI, 2018
170. Costa, J.A.V.; Lucas, B.F.; Alvarenga, A.G.P.; Moreira, J.B.; de Moraes, M.G. Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications, *Polysaccharides*, 2021, 759-772., <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040046>
171. Demirel, Zeliha & Yilmaz, Fethiye & Ozdemir, Guven & Dalay, Meltem. (2018). Influence of Media and Temperature on the Growth and the Biological Activities of *Desmodesmus protuberans* (F.E. Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18. 10.4194/1303-2712-v18_10_06.
172. Rajesha, J. & Ambati, Dr. Ranga Rao & Madhusudhan, Basavaraj & M, Karunakumar. (2010). Antibacterial Properties of Secoisolaricresinol Diglucoside Isolated from Indian Flaxseed Cultivars. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 4.
173. El Gamal AA. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J*. 2010 Jan;18(1):1-25. doi: 10.1016/j.jsps.2009.12.001. PMID: 23960716; PMCID: PMC3731014.
174. Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnol.* 8: 121-126
175. Barros, Pinto, Sigaud-Kutner, Cardozo, & Colepicolo, 2005, Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biol. Rhythm Res* 36,67-82
176. Thomas Chang, Souichi Ohta, Naoto Ikegami, Hideaki Miyata, Takashi Kashimoto, Masaomi Kondo, Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*, *Bioresource Technology*, Volume 44, Issue 2, 1993, Pages 149-153, ISSN 0960-8524, [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90189-I](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90189-I).
177. Ohta S, Shiomi Y, Kawashima A, Aozasa O, & Nakao T, Antibiotic Effect of Linolenic acid from *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella Primolecta* on methicillin-resistant *Staphyococcus aureus*, *Journal of Applied Phycology* 7, 121-137, 1995
178. Jose A. Mendiola, Diana Garcia-Martinez, F. Javier Ruperez, Pedro J. Martin-Alvarez, Guillermo Reglero, Alejandro Cifuentes, Coral Barbas, Elena Ibanez, Francisco J. Senor, "Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE", 2008, *J. of Supercritical Fluids* 43 484–489
179. Srinivasakumar, K. & Rajashekhar, M.. (2009). In vitro studies on bactericidal activity and sensitivity pattern of isolated marine microalgae against selective human bacterial pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*. 2. 10.17485/ijst/2009/v2i8/29503.
180. Krishnakumar, S. & Dooslin, V & Bai, Mercy & Rajan, And. (2013). Evaluation of bioactive metabolites from halophilic microalgae *Dunaliella Salina* by GC - MS analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5. 296-303.
181. Juan Eduardo Sosa-Hernández, Zamantha Escobedo-Avellaneda, Hafiz M. N. Iqbal and Jorge Welti-Chanes, "State-of-the-Art Extraction Methodologies for Bioactive Compounds from Algal Biome to Meet Bio-Economy Challenges and Opportunities", MDPI, 12 November 2018

182. Iqbal, H.M.N., "Development of Bio-Composites with Novel Characteristics through Enzymatic Grafting". Ph.D. Thesis, University of Westminster, London, UK, 2015. Available online: <https://westminsterresearch.westminster.ac.uk/item/9v61y/development-of-bio-composites-with-novel-characteristics-through-enzymatic-grafting>
183. Arevalo-Gallegos, A.; Ahmad, Z.; Asgher, M.; Parra-Saldivar, R.; Iqbal, H.M. "Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review". *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 99, 308–318.
184. Centella, M.H.; Arévalo-Gallegos, A.; Parra-Saldivar, R.; Iqbal, H.M., "Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio-and non-bio sectors". *J. Clean. Prod.* 2017, 168, 1559–1565.
185. Simoneau, C.; Naudin, C.; Hannaert, P.; Anklam, E. Comparison of classical and alternative extraction methods for the quantitative extraction of fat from plain chocolate and the subsequent application to the detection of added foreign fats to plain chocolate formulations. *Food Res. Int.* 2000, 33, 733–741
186. P. Dean, David C. Sigee, Beatriz Estrada, Jon K. Pittman Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology* 101, 2010, 4499–4507
187. Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 2013, 117, 426–436.
188. García-Pérez, J.S.; Robledo-Padilla, F.; Cuellar-Bermudez, S.P.; Arévalo-Gallegos, A.; Parra-Saldivar, R.; Zavala-Yoe, R.; Iqbal, H.M.N. Thermodynamics and statistical correlation between supercritical-CO₂ fluid extraction and bioactivity profile of locally available Mexican plants extracts. *J. Supercrit. Fluids* 2017, 122, 27–34.
189. Conde-Hernández, L.A.; Espinosa-Victoria, J.R.; Trejo, A.; Guerrero-Beltrán, J.Á. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *J. Food Eng.* 2017, 200, 81–86
190. Arranz, E.; Jaime, L.; de las Hazas, M.L.; Reglero, G.; Santoyo, S. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Ind. Crops Prod.* 2015, 67, 121–129
191. Maran, J.P.; Priya, B. Supercritical fluid extraction of oil from muskmelon (*Cucumis melo*) seeds. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2015, 47, 71–78.
192. Zacconi, F.C.; Cabrera, A.L.; Ordonez-Retamales, F.; del Valle, J.M.; Juan, C. Isothermal solubility in supercritical carbon dioxide of solid derivatives of 2, 3-dichloronaphthalene-1, 4-dione (dichlone): 2-(Benzylamino)-3-chloronaphthalene-1, 4-dione and 2-chloro-3-(phenethylamino) naphthalene-1, 4-dione. *J. Supercrit. Fluids* 2017, 129, 75–82
193. García-Pérez, J.S.; Cuéllar-Bermúdez, S.P.; Arévalo-Gallegos, A.; Salinas-Salazar, C.; Rodríguez-Rodríguez, J.; de la Cruz-Quiroz, R.; Iqbal, H.M.N.; Parra-Saldivar, R. Influence of Supercritical CO₂ Extraction on Fatty Acids Profile, Volatile Compounds and Bioactivities from *Rosmarinus officinalis*. *Waste Biomass Valorization* 2018, 1–11
194. Roodpeyma, M.; Guigard, S.E.; Stiver, W.H. Pressure control of a continuous pilot scale supercritical fluid extraction (SFE) process. *J. Supercrit. Fluids* 2018, 135, 120–129

195. García-Pérez, J.S.; Cuéllar-Bermúdez, S.P.; Arévalo-Gallegos, A.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Iqbal, H.M.N.; Parra-Saldivar, R. Identification of bioactivity, volatile and fatty acid profile in supercritical fluid extracts of Mexican arnica. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1528
196. Capuzzo, A.; Maffei, M.E.; Occhipinti, A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules* 2013, 18, 7194–7238
197. Núñez, G.A.; del Valle, J.M.; Navia, D. Supercritical CO₂ oilseed extraction in multi-vessel plants. 3. Effect of extraction pressure and plant size on production cost. *J. Supercrit. Fluids* 2017, 122, 109–118
198. Crespi, F.; Gavagnin, G.; Sánchez, D.; Martínez, G.S. Analysis of the Thermodynamic Potential of Supercritical Carbon Dioxide Cycles: A Systematic Approach. *J. Eng. Gas Turbines Power* 2018, 140, 051701
199. Carissimi, G.; Montalbán, M.G.; Baños, F.G.D.; Villora, G. High pressure phase equilibria for binary mixtures of CO₂ + 2-pentanol, vinyl butyrate, 2-pentyl butyrate or butyric acid systems. *J. Supercrit. Fluids* 2018, 135, 69–77.
200. Paula, J.T.; Sousa, I.M.; Foglio, M.A.; Cabral, F.A. Selective fractionation of extracts of *Arrabidaea chica* Verlot using supercritical carbon dioxide as antisolvent. *J. Supercrit. Fluids* 2018, 133, 9–16
201. Botelho, J.R.S.; Santos, A.G.; Araújo, M.E.; Braga, M.E.M.; Gomes-Leal, W.; Junior, R.N.C.; Oliveira, M.S. Copaiba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *J. Supercrit. Fluids* 2015, 98, 167–171
202. Corzzini, S.C.; Barros, H.D.; Grimaldi, R.; Cabral, F.A. Extraction of edible avocado oil using supercritical CO₂ and a CO₂/ethanol mixture as solvents. *J. Food Eng.* 2017, 194, 40–45
203. De Melo, M.M.R.; Sen, A.; Silvestre, A.J.; Pereira, H.; Silva, C.M. Experimental and modeling study of supercritical CO₂ extraction of *Quercus cerris* cork: Influence of ethanol and particle size on extraction kinetics and selectivity to friedelin. *Sep. Purif. Technol.* 2017, 187, 34–45
204. Chen, H.H.; Chung, C.C.; Wang, H.Y.; Huang, T.C. Application of Taguchi method to optimize extracted ginger oil in different drying conditions. *IPCBE* May 2011, 9, 310–316
205. Sharif, K.M.; Rahman, M.M.; Azmir, J.; Mohamed, A.; Jahurul, M.H.A.; Sahena, F.; Zaidul, I.S.M. Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. *J. Food Eng.* 2014, 124, 105–116
206. Mendiola, J.A.; Santoyo, S.; Cifuentes, A.; Reglero, G.; Ibanez, E.; Señoráns, F.J. Antimicrobial activity of sub-and supercritical CO₂ extracts of the green alga *Dunaliella salina*. *J. Food Prot.* 2008, 71, 2138–2143
207. Mendiola, J.A.; Marín, F.R.; Hernández, S.F.; Arredondo, B.O.; Señoráns, F.J.; Ibañez, E.; Reglero, G. Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1031–1038
208. Hilda Ma González, Ivone Almirall, Jesús Alpizar, Rodny Montes de Oca & Víctor Cerdà (2020) Determination of Vitamin E in *Spirulina Platensis* Extracts and Photoprotective Creams by Multi-Syringe Chromatography (MSC) and High-Performance

Liquid Chromatography (HPLC), 2020, Analytical Letters, 53:18, 2949-2959, DOI: 10.1080/00032719.

209. Mendes, R.L.; Nobre, B.P.; Cardoso, M.T.; Pereira, A.P.; Palavra, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg. Chim. Acta* 2003, 356, 328–334

210. Wang, S.Y.; Yang, L.; Zu, Y.G.; Zhao, C.J.; Sun, X.W.; Zhang, L.; Zhang, Z.H. Design and performance evaluation of ionic-liquids-based microwave-assisted environmentally friendly extraction technique for camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from samara of *camptotheca acuminata*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011, 50, 13620–13627

211. Ma, C.H.; Yang, L.; Zu, Y.G.; Liu, T.T. Optimization of conditions of solvent-free microwave extraction and study on antioxidant capacity of essential oil from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Food Chem.* 2012, 134, 2532–2539

212. Uy, S.F.; Easteal, A.J.; Farid, M.M.; Keam, R.B.; Conner, G.T. Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: a preliminary investigation. *Carbohydr. Res.* 2005, 340, 1357–1364

213. Navarro, D.A.; Flores, M.L.; Stortz, C.A. Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 2007, 69, 742–747

214. Chhatbar, M.; Meena, R.; Prasad, K.; Siddhanta, A.K. Microwave assisted rapid method for hydrolysis of sodium alginate for M/G ratio determination. *Carbohydr. Polym.* 2009, 76, 650–656.

215. Sousa, A.M.; Alves, V.D.; Morais, S.; Delerue-Matos, C.; Gonçalves, M.P. Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 2010, 101, 3258–3267

216. Rodriguez-Jasso, R.M.; Mussatto, S.I.; Pastrana, L.; Aguilar, C.N.; Teixeira, J.A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* 2011, 86, 1137–1144

217. Yuan, Y.; Macquarrie, D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* 2015, 129, 101–107.

218. Martino, E.; Ramaiola, I.; Urbano, M.; Bracco, F.; Collina, S. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 2006, 1125, 147–151

219. Wang, L.; Weller, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 2006, 17, 300–312

220. Alam, M.; Sarker, M.; Ghafoor, K.; Happy, R.A.; Ferdosh, S. Bioactive Compounds and Extraction Techniques. *Recover. Bioactive Compounds Agric. Wastes* 2017, 33–53

221. Ying, Z.; Han, X.; Li, J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chem.* 2011, 127, 1273–1279.

222. Letellier, M.; Budzinski, H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 1999, 27, 259–270

223. Letellier, M.; Budzinski, H.; Charrier, L.; Capes, S.; Dorthe, A.M. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 364, 228–237
224. Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Rev.* 2007, 1, 7–18.
225. Kaufmann, B.; Christen, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 2002, 13, 105–113
226. Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter, N.L.; Avdalovic, N.; Pohl, C. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1033–1039
227. Nieto, A.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R.M. Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 752–764
228. Tang, S.Y.; Bourne, R.A.; Smith, R.L.; Poliakoff, M. The 24 principles of green engineering and green chemistry: “IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY”. *Green Chem.* 2008, 10, 268–269
229. Otero, P.; Quintana, S.E.; Reglero, G.; Fornari, T.; García-Risco, M.R. Pressurized Liquid Extraction (PLE) as an Innovative Green Technology for the Effective Enrichment of Galician Algae Extracts with High Quality Fatty Acids and Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Mari. Drugs* 2018, 16, 156
230. Shang, Y.F.; Kim, S.M.; Lee, W.J.; Um, B.H. Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 111, 237–241.
231. Anaëlle, T.; Leon, E.S.; Laurent, V.; Elena, I.; Mendiola, J.A.; Stéphane, C.; Valérie, S.P. Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta* 2013, 104, 44–52
232. Fleurence, J.; Massiani, L.; Guyader, O.; Mabeau, S. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *J. Appl. Phycol.* 1995, 7, 393
233. Shen, L.; Wang, X.; Wang, Z.; Wu, Y.; Chen, J. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chem.* 2008, 107, 929–938
234. Kim, S.K. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011
235. Rosenthal, A.; Pyle, D.L.; Niranjana, K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 19, 402–420
236. Barzana, E.; Rubio, D.; Santamaria, R.I.; Garcia-Correa, O.; Garcia, F.; Ridaura Sanz, V.E.; López-Munguía, A. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4491–4496
237. Roufik, S.; Gauthier, S.F.; Turgeon, S.L. In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 294–302
238. Del Pilar Sánchez-Camargo, A.; Montero, L.; Stiger-Pouvreau, V.; Tanniou, A.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibáñez, E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem.* 2016, 192, 67–74

239. Puri, M.; Sharma, D.; Barrow, C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* 2012, 30, 37–44
240. Latif, S.; Anwar, F. Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009, 111, 1042–1048
241. Dunford, N.T.; Dunford, H.B. *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*, 1st ed.; AOCS Publishing: New York, NY, USA, 2004
242. Bhattacharjee, P.; Singhal, R.S.; Tiwari, S.R. Supercritical carbon dioxide extraction of cottonseed oil. *J. Food Eng.* 2007, 79, 892–898
243. Chemat, F.; Rombaut, N.; Meullemiestre, A.; Turk, M.; Perino, S.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, 41, 357–377
244. Dey, S.; Rathod, V.K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason. Sonochem.* 2013, 20, 271–276
245. Tian, H.; Yin, X.; Zeng, Q.; Zhu, L.; Chen, J. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 79, 577–582
246. Garcia-Vaquero, M.; Ummat, V.; Tiwari, B.; Rajauria, G. Exploring ultrasound, microwave and ultrasound-microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Mar. Drugs* 2020, 18, 172
247. Garcia-Vaquero, M.; O'Doherty, J.V.; Tiwari, B.K.; Sweeney, T.; Rajauria, G. Enhancing the extraction of polysaccharides and antioxidants from macroalgae using sequential hydrothermal-assisted extraction followed by ultrasound and thermal technologies. *Mar. Drugs* 2019, 17, 457
248. Youssouf, L.; Lallemand, L.; Giraud, P.; Soulé, F.; Bhaw-Luximon, A.; Meilhac, O.; D'Hellencourt, C.L.; Jhurry, D.; Couprie, J. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 2017, 166, 55–63
249. Dang, T.T.; Van Vuong, Q.; Schreider, M.J.; Bowyer, M.C.; Van Altna, I.A.; Scarlett, C.J. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *J. Appl. Phycol.* 2017, 29, 3161–3173
250. Rahimi, F.; Tabarsa, M.; Rezaei, M. Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: Optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. *J. Appl. Phycol.* 2016, 28, 2979–2990
251. Vázquez-Rodríguez, B.; Gutiérrez-Urbe, J.A.; Antunes-Ricardo, M.; Santos-Zea, L.; Cruz-Suárez, L.E. Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.* 2020, 32, 1441–1453
252. Tiwari, B.K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 71, 100–109
253. Saien, J.; Daneshamoz, S. Experimental studies on the effect of ultrasonic waves on single drop liquid–liquid extraction. *Ultrason. Sonochem.* 2018, 40, 11–16

254. Kentish, S.; Ashokkumar, M. The physical and chemical effects of ultrasound. In *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 1–12. ISBN 9781441974716
255. Leong, T.; Ashokkumar, M.; Kentish, S. The growth of bubbles in an acoustic field by rectified diffusion. In *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*; Springer: Singapore, 2016; pp. 69–98. ISBN 9789812872784
256. Young, F.R. *Cavitation*. McGraw-Hill: London, UK, 1989
257. Leighton, T.G. *The Acoustic Bubble*; Academ: San Diego, CA, USA, 1994
258. Leong, T.; Ashokkumar, M.; Sandra, K. The fundamentals of power ultrasound—A review. *Acoust. Aust.* 2011, 39, 54–63.
259. Lee, J.; Kentish, S.E.; Ashokkumar, M. The effect of surface-active solutes on bubble coalescence in the presence of ultrasound. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 5095–5099
260. Crum, L.A. Measurements of the growth of air bubbles by rectified diffusion. *J. Acoust. Soc. Am.* 1980, 68, 203–211
261. Piyasena, P.; Mohareb, E.; McKellar, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 87, 207–216.
262. Laborde, J.L.; Bouyer, C.; Caltagirone, J.P.; Gérard, A. Acoustic cavitation field prediction at low and high frequency ultrasounds. *Ultrasonics* 1998, 36, 581–587
263. Pico, Y: Ultrasound assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC in Analytical Chemistry*, 2013, 43,84-99
264. Ashokkumar, M.; Mason, T.J. Sonochemistry. *Encycl. Chem. Technol.* 2007, 247, 1439–1445
265. Orr, V.C.A.; Plechkova, N.V.; Seddon, K.R.; Rehmann, L. Disruption and Wet Extraction of the Microalgae *Chlorella vulgaris* Using Room-Temperature Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2016, 4, 591–600
266. Lu, W.; Alam, M.A.; Pan, Y.; Wu, J.; Wang, Z.; Yuan, Z. A new approach of microalgal biomass pretreatment using deep eutectic solvents for enhanced lipid recovery for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 2016, 218, 123–128
267. Mason, T.J.; Peters, D. An introduction to the uses of power ultrasound in chemistry. In *Practical Sonochemistry; Sonochemistry*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1999; pp. 1–48
268. Santos, H.M.; Lodeiro, C.; Capelo-Martinez, J.L. The Power of Ultrasound. In *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*; Capelo-Martínez, J.-L., Ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2009; pp. 1–16.
269. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017, 34, 540–560
270. Stramarkou, M.; Papadaki, S.; Kyriakopoulou, K. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 2017, 29, 2947–2960

271. Dang, T.T.; Van Vuong, Q.; Schreider, M.J.; Bowyer, M.C.; Altena, I.A.V.; Scarlett, C.J. The Effects of Drying on Physico-Chemical Properties and Antioxidant Capacity of the Brown Alga (*Hormosira banksii* (Turner) Decaisne). *J. Food Process. Preserv.* 2017, 41, 1–11.
272. Ampofo, J.; Abbey, L. Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. *Foods* 2022, 11, 1744
273. García-Pérez, P.; Lozano-Milo, E.; Landín, M.; Gallego, P.P. Combining medicinal plant in vitro culture with machine learning technologies for maximizing the production of phenolic compounds. *Antioxidants* 2020, 9, 210
274. Lorenzo, J.M.; Agregán, R.; Munekata, P.E.S.; Franco, D.; Carballo, J.; Sahin, S.; Lacomba, R.; Barba, F.J. Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Mar. Drugs* 2017, 15, 360.
275. Ganzler, K.; Salgó, A.; Valkó, K. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1986, 371, 299–306
276. Gong, M.; Bassi, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34, 1396–1412
277. Kadam, S.U.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 4667–4675
278. Hahn, T.; Lang, S.; Ulber, R.; Muffler, K. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochem.* 2012, 47, 1691–1698
279. Ali, M.; Watson, I.A. Microwave treatment of wet algal paste for enhanced solvent extraction of lipids for biodiesel production. *Renew. Energy* 2015, 76, 470–477
280. Chemat, F.; Rombaut, N.; Meullemiestre, A.; Turk, M.; Perino, S.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, 41, 357–377
281. Tatke, P.; Jaiswal, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Res. J. Med. Plant.* 2011, 5, 21–31
282. Zill-E-Huma. Microwave hydro-diffusion and gravity: A novel technique for antioxidants extraction. Ph.D. Thesis, Université d'Avignon, Avignon, France, December 2010
283. Veggi, P.C.; Martinez, J.; Meireles, M.A.A. Fundamentals of microwave extraction. In *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds*; Chemat, F., Cravotto, G., Eds.; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2012; pp. 15–52
284. Périno-Issartier, S.; Zill-e-Huma; Abert-Vian, M.; Chemat, F. Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food Bioprocess Technol.* 2011, 4, 1020–1028
285. R.V. Kapoore, T. O. Butler, J.P.Pandhal, S. Vaidyanathan. Microwave- Assisted Extraction for Microalgae: from Biofuels to Biorefinery, *MDPI Journal of Biology*, 2018.7.15 doi10.3390
286. Martins, R.; Sales, H.; Pontes, R.; Nunes, J.; Gouveia, I. Food Wastes and Microalgae as Sources of Bioactive Compounds and Pigments in a Modern Biorefinery: A Review. *Antioxidants* 2023, 12, 328

287. Udayan, A.; Pandey, A.K.; Sirohi, R.; Sreekumar, N.; Sang, B.-I.; Sim, S.J.; Kim, S.H.; Pandey, A. Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochem. Rev.* 2022, 21, 1–28
288. Saratale, R.G.; Ponnusamy, V.; Sirohi, R.; Piechota, G.; Shobana, S.; Dharmaraja, J.; Lay, C.h.; Saratale, G.D.; Shin, H.S.; Veermuthu, A. Microalgae cultivation strategies using cost-effective nutrient sources: Recent updates and progress towards biofuel production. *Bioresour. Technol.* 2022, 361, 127691
289. Zaharieva, M.M.; Zheleva-Dimitrova, D.; Rusinova-Videva, S.; Ilieva, Y.; Brachkova, A.; Balabanova, V.; Gevrenova, R.; Kim, T.C.; Kaleva, M.; Georgieva, A. Antimicrobial and antioxidant potential of *Scenedesmus obliquus* microalgae in the context of integral biorefinery concept. *Molecules* 2022, 27, 519
290. Zhao, L.; Chen, G.; Zhao, G.; Hu, X. Optimization of microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts. *Sep. Sci. Technol.* 2009, 44, 243–262
291. Ruen-Ngam, D.; Shotipruk, A.; Pavasant, P. Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Sep. Sci. Technol.* 2010, 46, 64–70
292. Pasquet, V.; Chérourvier, J.R.; Farhat, F.; Thiéry, V.; Piot, J.M.; Bérard, J.B.; Kaas, R.; Serive, B.; Patrice, T.; Cadoret, J.P.; Picot, L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* 2011, 46, 59–67
293. Esquivel-Hernández, D.; López, V.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Alemán-Nava, G.; Cuéllar-Bermúdez, S.; Rostro-Alanis, M.; Parra Saldívar, R. Supercritical carbon dioxide and microwave-assisted extraction of functional lipophilic compounds from *Arthrospira platensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, E658
294. Zhao, X.; Zhang, X.; Fu, L.; Zhu, H.; Zhang, B. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food Bioprod. Process.* 2016, 99, 197–203
295. Esquivel-Hernández, D.A.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Rostro-Alanis, M.; Cuéllar-Bermúdez, S.P.; Mancera-Andrade, E.I.; Núñez-Echevarría, J.E.; Saúl García-Pérez, J.; Chandra, R.; Parra-Saldívar, R. Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira platensis* and bioactivity evaluation. *Bioresour. Technol.* 2017, 224, 618–629.
296. Gilbert-López, B.; Barranco, A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylum tricornutum*. *Food Res. Int.* 2017, 99, 1056–1065
297. Koberg, M.; Cohen, M.; Ben-Amotz, A.; Gedanken, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 4265–4269
298. Patil, P.D.; Gude, V.G.; Mannarswamy, A.; Cooke, P.; Nirmalakhandan, N.; Lammers, P.; Deng, S. Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions. *Fuel* 2012, 97, 822–831.
299. Patil, P.D.; Reddy, H.; Muppaneni, T.; Mannarswamy, A.; Schuab, T.; Holguin, F.O.; Lammers, P.; Nirmalakhandan, N.; Cooke, P.; Deng, S. Power dissipation in microwave-

enhanced in situ transesterification of algal biomass to biodiesel. *Green Chem.* 2012, 14, 809–818

300. Patil, P.D.; Reddy, H.; Muppaneni, T.; Schaub, T.; Holguin, F.O.; Cooke, P.; Lammers, P.; Nirmalakhandan, N.; Li, Y.; Lu, X.; Deng, S. In situ ethyl ester production from wet algal biomass under microwave-mediated supercritical ethanol conditions. *Bioresour. Technol.* 2013, 139, 308–315

301. Martinez-Guerra, E.; Gude, V.G.; Mondala, A.; Holmes, W.; Hernandez, R. Extractive-transesterification of algal lipids under microwave irradiation with hexane as solvent. *Bioresour. Technol.* 2014, 156, 240–247

302. Ma, G.; Hu, W.; Pei, H.; Jiang, L.; Song, M.; Mu, R. In situ heterogeneous transesterification of microalgae using combined ultrasound and microwave irradiation. *Energy Convers. Manag.* 2015, 90, 41–46

303. Salgueiro, J.L.; Cancela, Á.; Sánchez, Á.; Maceira conditions for *Phaeodactylum Tricornutum* Microalgae. *Eur. J. Sustain. Dev.* 2015, 4, 89–96

304. Carreira-Casais, A.; Otero, P.; Garcia-Perez, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Carpena, M.; Soria-Lopez, A.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 9153. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>

305. Silva, M.E.T.; Martins, M.A.; Leite, M.O.; Milião, G.L.; Coimbra, J.S.R. Microalga *Scenedesmus obliquus*: Extraction of bioactive compounds and antioxidant activity. *Rev. Ciência Agronômica* 2021, 52, 1–8

306. Khatoon, H.; Rahman, N.A.; Suleiman, S.S.; Banerjee, S.; Abol-Munafi, A.B. Growth and proximate composition of *Scenedesmus obliquus* and *Selenastrum bibrainum* cultured in different media and condition. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 2019, 89, 251–257.

307. Vieira, B.B.; Soares, J.; Amorim, M.L.; Bittencourt, P.V.Q.; de Cássia Superbi, R.; de Oliveira, E.B.; dos Reis Coimbra, J.S.; Martins, M.A. Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. *Sep. Purif. Technol.* 2021, 269, 118711

308. Getachew, A.T.; Jacobsen, C.; Holdt, S.L. Emerging technologies for the extraction of marine phenolics: Opportunities and challenges. *Mar. Drugs* 2020, 18, 389

309. Nikolai, P.; Rabiyyat, B.; Aslan, A.; Ilmutdin, A. Supercritical CO₂ : Properties and technological applications-a review. *J. Therm. Sci.* 2019, 28, 394–430

310. Khaw, K.-Y.; Parat, M.-O.; Shaw, P.N.; Falconer, J.R. Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules* 2017, 22, 1186

311. Georgiopoulou, I.; Tzima, S.; Pappa, G.D.; Louli, V.; Voutsas, E.; Magoulas, K. Experimental Design and Optimization of Recovering Bioactive Compounds from *Chlorella vulgaris* through Conventional Extraction. *Molecules* 2021, 27, 29.

312. Laina, K.M.; Eleni, P.N.; Tsitseli, K.G.; Krokida, M.K. Process Design for the Extraction of Bioactive Compounds from Several Mediterranean Medicinal Plants. *Chem. Eng. Trans.* 2021, 86, 1327–1332

313. Georgiopoulou, I.; Tzima, S.; Louli, V.; Magoulas, K. Process Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Compounds from *Chlorella vulgaris* and Comparison with Conventional and Supercritical Fluid Extraction. *Appl. Sci.* 2023,
314. Shang, A.; Luo, M.; Gan, R.-Y.; Xu, X.-Y.; Xia, Y.; Guo, H.; Liu, Y.; Li, H.-B. Effects of microwave-assisted extraction conditions on antioxidant capacity of sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.). *Antioxidants* 2020, 9, 678
315. Bachtler, S.; Bart, H.-J. Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. *Food Bioprod. Process.* 2021, 125, 1–13
316. Nguyen, N.H.K.; An, N.T.D.; Anh, P.K.; Truc, T.T. Microwave-assisted extraction of chlorophyll and polyphenol with antioxidant activity from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. in Vietnam. In *Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Coimbatore, India, 8–9 April 2021; p. 012039
317. Georgiopoulou, I.; Tzima, S.; Louli, V.; Magoulas, K. Supercritical CO₂ Extraction of High-Added Value Compounds from *Chlorella vulgaris*: Experimental Design, Modelling and Optimization. *Molecules* 2022, 27, 5884.
318. Lorenzen, J.; Igl, N.; Tippelt, M.; Stege, A.; Qoura, F.; Sohling, U.; Brück, T. Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2017, 40, 911–918
319. Kavoura, D.; Kyriakopoulou, K.; Papaefstathiou, G.; Spanidi, E.; Gardikis, K.; Louli, V.; Aligiannis, N.; Krokida, M.; Magoulas, K. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia fruticosa*. *J. Supercrit. Fluids* 2019, 146, 159–164
320. Morcelli, A.; Cassel, E.; Vargas, R.; Rech, R.; Marcílio, N. Supercritical fluid (CO₂+ethanol) extraction of chlorophylls and carotenoids from *Chlorella sorokiniana*: COSMO-SAC assisted prediction of properties and experimental approach. *J. CO₂ Util.* 2021, 51, 101649
321. Mandal, R.; Dutta, G. From photosynthesis to biosensing: Chlorophyll proves to be a versatile molecule. *Sens. Int.* 2020, 1, 100058
322. Georgiopoulou, I.; Louli, V.; Magoulas, K. Comparative Study of Conventional, Microwave-Assisted and Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Microalgae: The Case of *Scenedesmus obliquus*. *Separations* 2023, 10, 290. <https://doi.org/10.3390/separations10050290>
323. A. F. Nisya, R. Rochmadi A. Budiman. Ultrasound assisted extraction of microalgae *Spirulina sp.* 2023, *AIP Conf. Proc.* 2667, <https://doi.org/10.1063/5.0112300>
324. Ying Liu, Xin Liu, Yan Cui, Wenqiao Yuan, Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 87, 2022, 106054, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>.
325. K. W. Chew, K. S. Khoo, H. T. Foo, S. R. C., R. Walvekar, S. S. Lim. Algae utilization and its role in the development of green cities, *Chemosphere*, Volume 268, 2021, 129322, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129322>.
326. K. S. Khoo, Y. M. Chong, W. S. Chang, J. M. Y., S. C. Foo, I. Khoiroh, P. L. Lau, K. W. Chew, C. W. Ooi, P. L. Show. Permeabilization of *Chlorella sorokiniana* and extraction of lutein by distillable CO₂-based alkyl carbamate ionic liquids, *Separation and Purification Technology*, Volume 256, 2021, 117471, ISSN 1383-5866, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117471>.

327. Lee, S.Y., Khoiroh, I., Vo, DV.N. et al. Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. *Environ Chem Lett* 19, 231–251 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01088-5>
328. K. S. Khoo, K. W. Chew, G. Y. Yew, W. H. Leong, Y. H. Chai, P. L. Show, W.H. Chen, Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production, *Bioresource Technology*, Volume 304, 2020, 122996, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122996>.
329. C. Nitsos, R. Filali, B. Taidi, J. Lemaire, Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review, *Biotechnology Advances*, Volume 45, 2020, 107650, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>.
330. M. Wang, S. Chen, W. Zhou, W. Yuan, D. Wang. Algal cell lysis by bacteria: A review and comparison to conventional methods, *Algal Research*, Volume 46, 2020, 101794, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101794>.
331. X. Hao, H. Suo, H. Peng, P. Xu, X. Gao, S. Du, Simulation and exploration of cavitation process during microalgae oil extracting with ultrasonic-assisted for hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 46, Issue 3, 2021, Pages 2890-2898, ISSN 0360-3199, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.045>
332. K. S. Khoo, K. W. Chew, G. Y. Yew, S. Manickam, C. W. Ooi, P. L. Show, Integrated ultrasound-assisted liquid biphasic flotation for efficient extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 67, 2020, 105052, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105052>.
333. G. Ma, R. Mu, S. C. Capareda & Feng, 2021. Use of ultrasound for aiding lipid extraction and biodiesel production of microalgae harvested by chitosan, *Environmental Technology*, 42:26, 4064-4071, DOI: 10.1080/09593330.2020.1745288
334. R.M. González-Balderas, S.B. Velásquez-Orta, I. Valdez-Vazquez, M.T. Orta Ledesma, Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus* sp. by using ultrasound or ozone, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 62, 2020, 104852, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852>.
335. Khawli, F.A.; Martí-Quijal, F.J.; Pallarés, N.; Barba, F.J.; Ferrer, E. Ultrasound Extraction Mediated Recovery of Nutrients and Antioxidant Bioactive Compounds from *Phaeodactylum tricornutum* Microalgae. *Appl. Sci.* 2021, 11, 1701. <https://doi.org/10.3390/app11041701>
336. Pagels, F.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Guedes, A.C. Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria—A Review on Current Methodologies. *Appl. Sci.* 2021, 11, 5187. <https://doi.org/10.3390/app11115187>
337. J. Zhang, Y. He, M. Luo, F. Chen. Utilization of enzymatic cell disruption hydrolysate of *Chlorella pyrenoidosa* as potential carbon source in algae mixotrophic cultivation, *Algal Research*, Volume 45, 2020, 101730, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101730>
338. E. M. Rojo, A. A. Filipigh, S. Bolado. Assisted-enzymatic hydrolysis vs chemical hydrolysis for fractional valorization of microalgae biomass, *Process Safety and Environmental Protection*, Volume 174, 2023, Pages 276-285, ISSN 0957-5820, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.03.067>

339. P. Ardiles, P. Cerezal-Mezquita, F. Salinas-Fuentes, D. Órdenes, G. Renato, M. Carmen Ruiz-Domínguez. Biochemical Composition and Phycoerythrin Extraction from Red Microalgae: A Comparative Study Using Green Extraction Technologies Processes 2020, 8(12), 1628; <https://doi.org/10.3390/pr8121628>
340. D. García, I. de Godos, C. Domínguez, S. Turiel, S. Bolado, R. Muñoz. A systematic comparison of the potential of microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortia for the treatment of piggery wastewater, Bioresource Technology, Volume 276, 2019, Pages 18-27, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.095>.
341. A. Görgüç, P. Özer, F. M. Yılmaz. Microwave-assisted enzymatic extraction of plant protein with antioxidant compounds from the food waste sesame bran: Comparative optimization study and identification of metabolomics using LC/Q-TOF/MS, 2020, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14304>
342. Lutz Grossmann, Jörg Hinrichs & Jochen Weiss, 2020. Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60:17, 2961-2989, DOI: 10.1080/10408398.2019.1672137
343. Hildebrand, G., Poojary, M.M., O'Donnell, C. et al. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. J Appl Phycol 32, 1709–1718 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>
344. Ríos-González, L.J., Medina-Morales, M.A., Rodríguez-De la Garza, J.A., Romero-Galarza, A., Medina, D.D., Morales-Martínez, 2021. Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. Bioresour Technol 319, 124099. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.124099>
345. E. Rojo, M. Piedra, I. González, A.M. Vega, S Bolado Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis Bioresour. Technol., 125256 (2021), 10.1016/j.biortech.2021.125256
346. M. Singla, N. Sit Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: a review Ultrason Sonochem. 2021, 10.1016/j.ultsonch.2021.105506
347. L. Wen, Z. Zhang, D.W. Sun, S.P. Sivagnanam, B.K. Tiwari Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2020
348. E. Sowan, M.S. Mozumder, H. Taher, S. Al-Zuhair. Innovative Approaches to Enhanced Enzymatic Microalgae-to Biodiesel Production, ChemBioEng, 2023, <https://doi.org/10.1002/cben.202300009>
349. Padil, M. D. Putra, M. Hidayat, R.S. Kasiamdari, A. Mutamima, K. Iwamoto, M. A. Darmawan, M. Gozan. Mechanism and kinetic model of microalgal enzymatic hydrolysis for prospective bioethanol conversion, RSC Adv., 2023, 13, 21403
350. L Zhang, L. Wang, H. Nie, C. Liu, "The Analysis on the Current Situation of the Utilization Mode of Microalgal Biomass Materials", Advances in Multimedia, vol. 2022, Article ID 1002952, 9 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1002952>
351. Silva, M.; Kamberovic, F.; Uota, S.T.; Kovan, I.-M.; Viegas, C.S.B.; Simes, D.C.; Gangadhar, K.N.; Varela, J.; Barreira, L. Microalgae as Potential Sources of Bioactive

- Compounds for Functional Foods and Pharmaceuticals. *Appl. Sci.* 2022, 12, 5877. <https://doi.org/10.3390/app12125877>
352. S. Santoyo, M. Plaza, L. Jaime, E. Ibanez, G. Reglero, F.J. Senorans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 8522
353. K.H.M. Cardozo, T. Guaratini, M.P. Barros, V.R. Falcão, A.P. Tonon, N.P. Lopes, S. Campos, M.A. Torres, A.O. Souza, P. Colepicolo, E. Pinto, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, C 146, 60.
354. A.Z. Mustopa, R. Isworo, M. Nurilmala, D. Susilainingsih, *Annales Bogorienses*, 2016, 20(2), 47
355. D. Martin-Creuzburg, P. Merkel, *Journal Plankton Research*, 2016, 38(4), 865.
356. H.G. Gerken, B. Donohoe, E.P. Knoshaug, *Planta*, 2013, 237(1), 239.
357. A. Ilavarasi, D. Pandiaraj, D. Mubarakali, M.H. Ilyas, N. Thajuddin, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15, 883.
358. H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, *Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy*, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001, UNIT F4.3.
359. J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, *Journal of Food Engineering*, 2013, 117(4), 426
360. C. Moraru, K. Skjanes, D. Patras, C. Socaciu, C.JJ Spetz, *Proc. 18th Int. Symp. On Carotenoids, Basel, 9-14 July 2017 (poster presentation)*.
361. De Jesus, S.S.; Ferreira, G.F.; Moreira, L.S.; Wolf Maciel, M.R.; Maciel Filho, R. Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renew. Energy* 2019, 143, 130–141.
362. Haria Santoro, Monica Nardi, Cinzia Benincasa, Paola Constanzo, Girolamo Giordano, Antonio Procopio and Giovani Sindona, 2019, Sustainable and selective Extraction of Lipids and Bioactive Compounds from Microalgae. [Doi:10.3390/molecules24234347](https://doi.org/10.3390/molecules24234347)
363. J.P. Pérez, A.A. Muñoz, C. P. Figueroa, C. Agurto-Muñoz. Current analytical techniques for the characterization of lipophilic bioactive compounds from microalgae extracts, *Biomass and Bioenergy*, Volume 149, 2021, 106078, ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106078>.
364. A.T. Soares, D.C. da Costa, A.A.H. Vieira, N.R. Antoniosi Filho. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae, *Heliyon*, Volume 5, Issue 4, 2019, e01529, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01529>.
365. W. Levasseur, P. Perré, V. Pozzobon, A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification, *Biotechnology Advances*, Volume 41, 2020, 107545, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>.
366. M. Garcia-Vaquero, H. Dominguez, L. Pereira, S. Kraan. Green extraction of bioactive compounds from microalgae and seaweeds, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals (Second Edition)*, Woodhead Publishing, 2023, Pages 115-147, ISBN 9780323988193, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98819-3.00013-4>.

367. T. Lafarga, I. Clemente, M. Garcia-Vaquero. Carotenoids from microalgae, *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*, Academic Press, 2020, Pages 149-187, ISBN 9780128170670, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817067-0.00005-1>.
368. H.T.D. Nguyen, A. Ramli, L.M. Kee. A Review on Methods Used in Analysis of Microalgae Lipid Composition, *Journal of the Japan Institute of Energy*, 2017, Volume 96, Issue 12, Pages 532-537, Released on J-STAGE December 28, 2017, Online ISSN 1882-6121, Print ISSN 0916-8753, <https://doi.org/10.3775/jie.96.532>
369. T.N.B. Tengku Ibrahim, N. A. Suzianti Feisal, N.H. Kamaludin, W.Y. Cheah, V. How, A. Bhatnagar, Z. Ma, P. L. Show. Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: A comprehensive review, *Bioresource Technology*, Volume 372, 2023, 128661, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128661>.
370. V. Sousa, R.N. Pereira, A.A. Vicente, O. Dias, P. Geadá. Microalgae biomass as an alternative source of biocompounds: New insights and future perspectives of extraction methodologies, *Food Research International*, Volume 173, Part 1, 2023, 113282, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113282>
371. P. Geadá, C. Moreira, M. Silva, R. Nunes, L. Madureira, C. M.R. Rocha, R.N. Pereira, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties, *Bioresource Technology*, Volume 332, 2021, 125125, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125125>.
372. L.A. Rodrigues, C.V. Pereira, I.C. Leonardo, N. Fernández, F.B. Gaspar, J.M. Silva, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, A. Paiva, A.A. Matias. Terpene-Based Natural Deep Eutectic Systems as Efficient Solvents To Recover Astaxanthin from Brown Crab Shell Residues *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2020** 8 (5), 2246-2259 DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b06283
373. M. Bhattacharya, S. Goswami. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 25, 2020, 101580, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580>.
374. M. Namiki. Antioxidants/antimutagens in food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1990, 29:4, 273-300, DOI: 10.1080/10408399009527528
375. Asevedo, E. A., das Chagas, B. M. E., de Oliveira Júnior, S. D., & dos Santos, E. S. (2023). Recovery of lipids and carotenoids from *Dunaliella salina* microalgae using deep eutectic solvents. *Algal Research*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102940>.
376. MARKETS, M. Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Canthaxanthin, and Zeaxanthin), Application (Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, and Pharmaceuticals), Source, Formulation, and Region—Global Forecast to 2026. 2020.
377. M. Cunha, V. Sousa, P. Geadá, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, O. Dias. Systems biology's role in leveraging microalgal biomass potential: Current status and future perspectives, *Algal Research*, Volume 69, 2023, 102963, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102963>
378. R. Gallego, M. Bueno, A.M. Chourio, E. Ibáñez, M.D.A. Saldaña, M. Herrero, Use of high and ultra-high pressure based-processes for the effective recovery of bioactive compounds from *Nannochloropsis oceanica* microalgae, *The Journal of Supercritical Fluids*, Volume 167, 2021, 105039, ISSN 0896-8446, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105039>

379. P. Ferreira-Santos, S.M. Miranda, I. Belo, G. Spigno, J.A. Teixeira, C.M.R. Rocha, Sequential multi-stage extraction of biocompounds from *Spirulina platensis*: Combined effect of ohmic heating and enzymatic treatment, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 71, 2021, 102707, ISSN 1466-8564, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102707>.
380. D. Carullo, B.D. Abera, A.A. Casazza, F. Donsi, P. Perego, G. Ferrari, G. Pataro. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*, *Algal Research*, Volume 31, 2018, Pages 60-69, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.017>.
381. M. Chronis, V.M. Christopoulou, S. Papadaki, M. Stramarkou, M. Krokida, "Optimization of Mild Extraction Methods for the Efficient Recovery of Astaxanthin, a Strong Food Antioxidant Carotenoid from Microalgae", *Chem. Eng. Trans.*, 2021, doi: 10.3303/cet2187026
382. M. Stramarkou, S. Papadaki, K. Kyriakopoulou, I. Tzovenis, M. Chronis, M. Krokida, "Comparative Analysis of Different Drying Techniques Based on the Qualitative Characteristics of *Spirulina platensis* Biomass", *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2021, DOI: 10.1080/10498850.2021.1900969
383. Panis και Carreon, 2016 Panis G., Carreon J.R., 2016, "Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line", *Algal Research*, 18, 175-190
384. Zhang et al., 2016 Zhang Z., Wang B., Hu Q., 2016, "A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*", *Biotechnology and Bioengineering*, 113(10), 2088–2099
385. Wan M., Zhang J., Hou D., 2014, "The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation", *Bioresource Technology*, 167, 276-283
386. Gao, Z., Meng C., Chen Y. C., 2015, "Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress", *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1853–1860
387. Borowitzka M. A., 2013, High-value products from microalgae-their development and commercialisation, *Journal of Applied Phycology*, 25, 743–756
388. Chekanov, K. , Lobakova E., Selyakh I., 2014, Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia), *Marine Drugs*, 12(8), 4504–4520
389. S. Nagaraja, P. Arulmurugana , M.G. Rajarama , R. Sundararajb, R. Rengasamy, "Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow", *Phykos* 42 (1): 59– 71 (2012)
390. T. Göksan, İ. Ak, C. Kılıç, "Growth Characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as Affected by Nitrogen Source, Vitamin, Light and Aeration", *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11: 377-383 (2011), DOI: 10.4194/1303-2712-v11_3_06
391. 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), 64–70.
392. Zou T.B., Jia Q., Li H.W., 2013, Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Marine Drugs*, 11(5), 1644–1655.
393. Papadaki S., Kyriakopoulou K., Krokida M., 2016, Recovery and Encapsualtion of Bioactive Extracts from *Haematococcus Pluvialis* and *Phaedodactylum Tricornutum* for food Applications', *IOSR Journal of Environmental Science*, 10(12), 2319–2399.

394. Deenu A., Naruenartwongsakul, S. and Kim, S. M., 2013, Optimization and economic evaluation of ultrasound extraction of lutein from *Chlorella vulgaris*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(6), 1151–1162.
395. European Parliament Council, 2009, Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the member states on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients, <<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:141:0003:0011:EN:PDF>> accessed 06.04.2021.
396. Sun J., 2007, 'D-Limonene : D-Limonene, *Alternative Medicine*, 12(3), 259–264.
397. Golmakani M. T., Mendiola J.A., Rezaei K., 2014, Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms, *Journal of Supercritical Fluids*, 92, 1–7
398. M.P. St-Onge, A. Bosarge, L.L. T. Goree, B. Darnell, Medium Chain Triglyceride Oil Consumption as Part of a Weight Loss Diet Does Not Lead to an Adverse Metabolic Profile When Compared to Olive Oil *Pages 547-552, 2008, <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719737>*
399. Raposo M. F. de J., de Morais A. M. M. B., de Morais R. M. S. C., 2015, Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases, *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(8), 5128–55.
400. Raposo M. F. J., Morais A. M. M. B., Morais R. M. S. C., 2012, Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1253–1257.
401. K.T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, P. Regal *Review of methods for analysis of carotenoids* *Trends in Analytical Chemistry* Volume 56, April 2014, Pages 49-73 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>
402. T. R. Parsons, Y. Maita, C. M. Lalli, "A manual of chemical and biological methods for seawater analysis", 1984
403. Hamilton, P. B., 1984. The role of mycotoxins in malabsorption syndrome. Pages 18-21 in: *Proceedings Poultry Nutrition Short Course*. Univ. Del. Coop. Ext. Service, Georgetown, DE.
404. J. Li, J. Wang, M. Wu, H. Cheng, L. Chen, Z. Qi, "Deep Deterpenation of Citrus Essential Oils Intensified by In Situ Formation of a Deep Eutectic Solvent in Associative Extraction" *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2020, 59, 19, 9223–9232 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c00442>
405. Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., 2014, Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review, *Marine Drugs*, 12, 128–152
406. Kang C.D., Sim S.J., 2008, Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils, *Biotechnology Letters*, 30(3), 441–444
407. P. B. Jacobs, R. D. LeBoeuf, S. A. McCommas, and J. D. Tauber, "The cleavage of carotenoid esters by cholesterol esterase," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, vol. 72, no. 1, pp. 157–160, 1982
408. Papadaki S., Krokida M., Economides D., 2014, Dyeing of chemical pulp with natural dyes, *Cellulose Chemistry and Technology*, 48(3–4), 385–393.
409. Rostagno M. a., Palma M., Barroso C. G., 2003, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119–128
410. Desai M. A., Parikh, J., 2015, Extraction of essential oil from leaves of lemongrass using microwave radiation: Optimization, comparative, kinetic, and biological studies, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3, 421–431.

411. S. Machmudah, A. Shotipruk, M. Goto, M. Sasaki, T. Hirose, "Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Using Supercritical CO₂ and Ethanol as Entrainer", *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006, 45, 10, 3652–3657, <https://doi.org/10.1021/ie051357k>
412. Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A., 2008. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 99, 3110–3115. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.062
413. J. Chan. Extracting Lipid and Carotenoids from Microalgae with Lecithin Linker Microemulsions, 2013, Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry University of Toronto
414. Owen P. Ward, Ajay Singh Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production *Process Biochemistry* Volume 40, Issue 12, December 2005, Pages 3627-3652 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>
415. Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 495–505. doi:10.1080/07315724.2002.10719248
416. Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.), in: *Aquaculture*. pp. 309–323. doi:10.1016/S0044-8486(03)00298-9
417. R. V. Kapoore, T. O. Butler, J. Pandhal, S. Vaidyanathan, "Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery", MDPI, *Biology*, 2018, 7, 18; doi:10.3390/biology7010018
418. C.L. Chen, J.S. Chang, D.J. Lee, "Dewatering and Drying Methods for Microalgae", *Drying Technology, An International Journal*, Volume 33, 2015 - Issue 4: Sludge Drying and Dehydration Pages 443-454, <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.997881>
419. Ma X, Mi Y, Zhao C, Wei Q. A comprehensive review on carbon source effect of microalgae lipid accumulation for biofuel production. *Sci Total Environ.* 2022;806:151387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151387>
420. Chamola R, Khan MF, Raj A, Verma M, Jain S. Response surface methodology-based optimization of in situ transesterification of dry algae with methanol, H₂SO₄ and NaOH. *Fuel.* 2019;239:511–20. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.038>
421. Shi Z, Zhao B, Tang S, Yang X. Hydrotreating lipids for aviation biofuels derived from extraction of wet and dry algae. *J Clean Prod.* 2013;204:906–15. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.351>
422. Yazdanabad SK, Samimi A, Shokrollahzadeh S, Kalhori DM, Moazami N, Ibáñez González MJ, Mazzuca Sobczuk T, Molina GE. Microalgae biomass dewatering by forward osmosis: review and critical challenges. *Algal Res.* 2021;56:102323. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102323>
423. H. Aljabri, M. Cherif, S.A. Siddiqui, T. Bounnit, I. Saadaoui, "Evidence of the drying technique's impact on the biomass quality of *Tetraselmis subcordiformis* (Chlorophyceae)", *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2023, <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02335-x>
424. Patil V, Tran KQ, Giselrød HR. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *Int J Mol Sci.* 2008;9:1188–95. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>.

425. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energy Rev.* 2010;14:557–77. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
426. Stramarkou, M.; Papadaki, S.; Kyriakopoulou, K.; Krokida, M. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 2017, 29, 2947–2960
427. Wang J, Zhang M, Fang Z. “Recent development in efficient processing technology for edible algae: a review”, *Trends Food Science and Technology*, 2019. 2019;88:251–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.032>.
428. Hosseinizand H, Sokhansanj S, Lim CJ. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Dry Technol.* 2018;36:1049–60. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>
429. Jaime L, Mendiola JA, Herrero M, Soler-Rivas C, Santoyo S, Senorans FJ, Ibanez E. 2005. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J Sep Sci.* 28(16):2111–19.
430. Aouir A, Amiali M, Bitam A, Benchabane A, Raghavan VG. 2017. Comparison of the biochemical composition of different *arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA. *J Food Meas Charact.* 11:913–23.
431. Moraes CC, Sala L, Cerveira GP, Kalil SJ. 2011. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian J Chem Eng.* 28(1):45–49.
432. Silveira ST, Burkert JFM, Costa JAV, Burkert CAV, Kalil SJ. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour Technol.* 98(8):1629–34.
433. Dey S, Rathod VK. 2013. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason Sonochem.* 20(1):271–76.
434. Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Sato S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenergy.* 26(4):329–35.
435. Rangel-Yagui CDO, Danesi EDG, De Carvalho JCM, Sato S. 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour Technol.* 92(2):133–41.
436. Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. 2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. *Electron J Environ Agric Food Chem.* 8(11):1099–112.
437. Chang Y, Wu Z, Bian L, Feng D, Leung DYC. 2013. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Appl Energy.* 102:427–31.
438. Stramarkou M, Papadaki S, Konstantina Kyriakopoulou MK. 2017. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol.* 29:1–14.
439. Y. Durmaz, M. Kilicli, O. S. Toker, N. Konar, I. Palabiyik, F. Tamtürk, “Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: Effect on physicochemical and functional properties”, *Algal Research* Volume 47, May 2020, 101811

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101811>

440. H. Zhang, T. Gong, J. Li, B. Pan, Q. Hu, M. Duan, X. Zhang, "Study on the Effect of Spray Drying Process on the Quality of Microalgal Biomass: a Comprehensive Biocomposition Analysis of Spray-Dried *S. acuminatus*", *Biomass, BioEnergy Research*, 2022, 15:320–333 <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10343-8>

441. Tzima, S.; Georgiopoulou, I.; Louli, V.; Magoulas, K. Recent Advances in Supercritical CO₂ Extraction of Pigments, Lipids and Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules* 2023, 28, 1410

442. B. Thevarajah, G.K.S. Hasara Nishshanka, M. Premaratne, P.H.V. Nimarshana, D. Nagarajan, J.S. Chang, T.U. Ariyadasa. Large-scale production of *Spirulina*-based proteins and c-phycocyanin: A biorefinery approach, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 185, 2022, 108541, ISSN 1369-703X, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108541>.

443. Lijassi, I., Arahou, F., EL Habacha, G. et al. Optimization and Characterization of *Spirulina* and *Chlorella* Hydrolysates for Industrial Application. *Appl Biochem Biotechnol* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04596-6>

444. I. Priyadarshani, B. Rath, "Commercial and industrial applications of micro algae - A review". *J. Algal Biomass Utiln.* 2012, 3 (4): 89-100

445. Z. Liu, N. Hao, Y. Hou, Q. Wang, Q. Liu, S. Yan, F. Chen, L. Zhao, "Technologies for harvesting the microalgae for industrial applications: Current trends and perspectives", *Bioresource Technology*, Volume 387, November 2023, 129631, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129631>

446. F. Camacho, A. Macedo, F. Malcata, Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review", *Marine Drugs*, 2019

447. M.S.G. Kafyra, S. Papadaki, M. Chronis, M. Krokida, "Microalgae based innovative animal fat and proteins replacers for application in functional baked products", *Open Agriculture*, 2018; 3: 427–436, <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0047>

448. Tokuşoglu O., Uunal M.K., Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*, *J. Food Sci.*, 2003, 68, 1144–1148

449. Mickleborough T.D., Omega-3 polyunsaturated fatty acids in physical performance optimization, *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 2013, 23, 83-96

450. Da Boit M., Hunter A.M., Gray S.R., Fit with good fat? The role of n-3 polyunsaturated fatty acids on exercise performance, *Metabolism.*, 2017, 66, 45-54

451. Panahi Y., Mostafazadeh B., Abrishami A., Saadat A., Beiraghdar F., Tavana S., et al., Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers, *Clin. Lab.*, 2013, 59, 579–587

452. Safi C., Ursu A.V., Laroche C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.Y., et al., Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods, *Algal Res.*, 2014, 3, 61–65

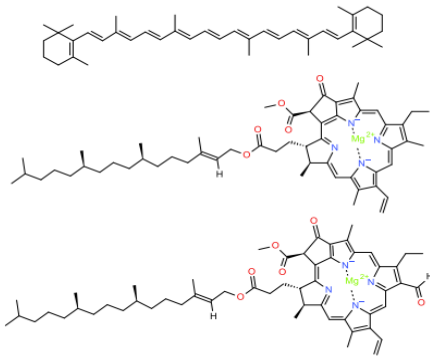
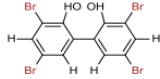
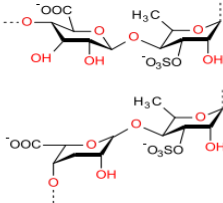
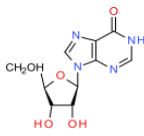
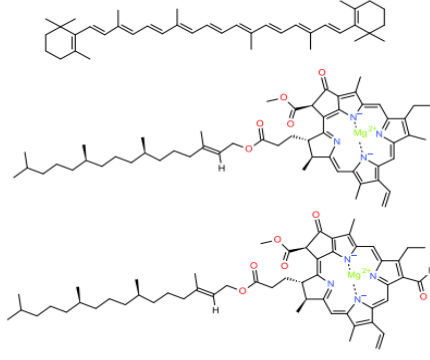
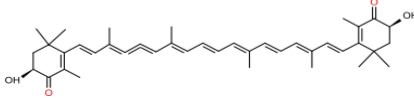
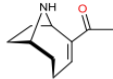
453. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.S., Abert-Vian M., Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.*, 2017, 34, 540-560

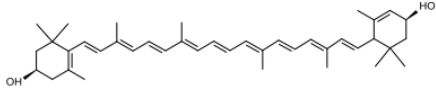
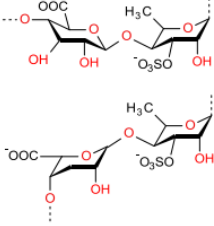
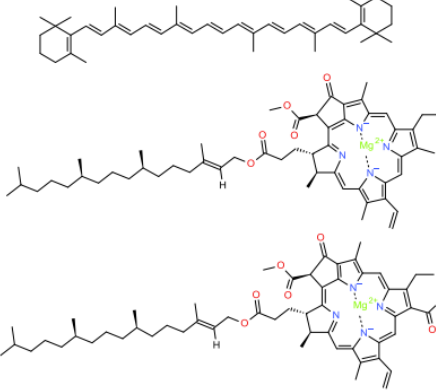
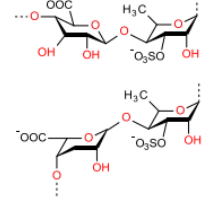
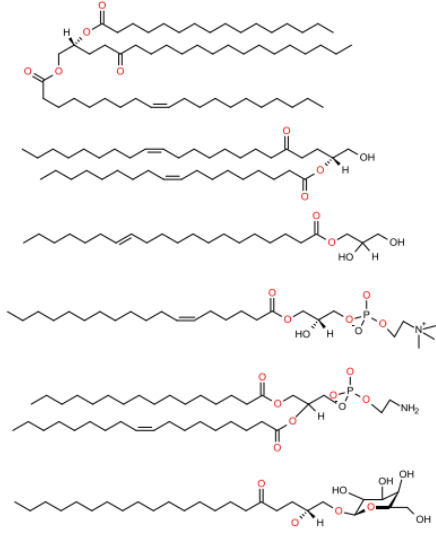
454. Halim R., Danquah M.K., Webley P.A., Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30, 709-732

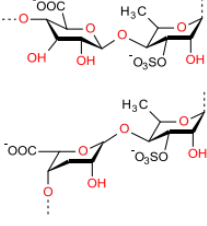
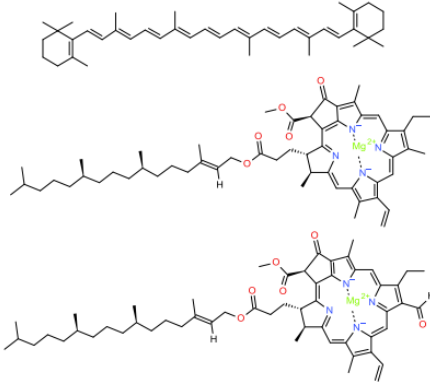
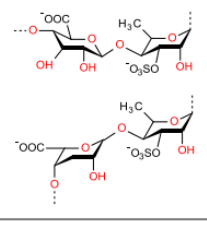
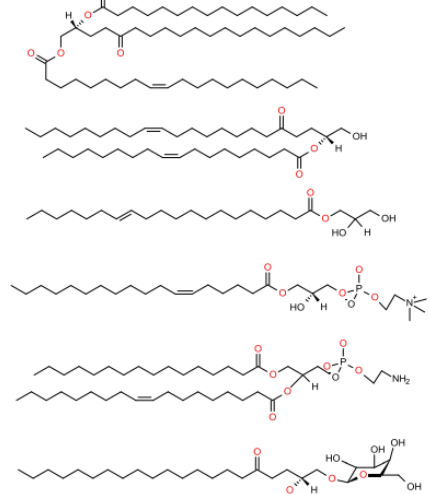
455. Ritu, J.R., Ambati, R.R., Ravishankar, G.A. et al. Utilization of astaxanthin from microalgae and carotenoid rich algal biomass as a feed supplement in aquaculture and poultry industry: An overview. *J Appl Phycol* 35, 145–171 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02817-9>
456. Eze CN, Onyejiaka CK, Ihim SA, Ayoka TO, Aduba CC, Ndukwe JK, Nwaiwu O, Onyeaka H. Bioactive compounds by microalgae and potentials for the management of some human disease conditions. *AIMS Microbiol.* 2023 Feb 7;9(1):55-74. doi: 10.3934/microbiol.2023004. PMID: 36891530; PMCID: PMC9988413.
457. Wu, J., Gu, X., Yang, D., Xu, S., Wang, S., Chen, X., & Wang, Z. (2021). Bioactive substances and potentiality of marine microalgae. *Food Science & Nutrition*, 9, 5279–5292. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2471>
458. Wang, Q.; Zhang, H.; Jin, Q.; Wang, X. Effects of Dietary Plant-Derived Low-Ratio Linoleic Acid/Alpha-Linolenic Acid on Blood Lipid Profiles: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods* 2023, 12, 3005. <https://doi.org/10.3390/foods12163005>
459. Stiefvatter L, Neumann U, Rings A, Frick K, Schmid-Staiger U, Bischoff SC. The Microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Is Well Suited as a Food with Positive Effects on the Intestinal Microbiota and the Generation of SCFA: Results from a Pre-Clinical Study. *Nutrients*. 2022 Jun 16;14(12):2504. doi: 10.3390/nu14122504. PMID: 35745233; PMCID: PMC9229211.
460. Ting-Bin Hao, Yu-Feng Yang, Srinivasan Balamurugan, Da-Wei Li, Wei-Dong Yang, Hong-Ye Li, Enrichment of f/2 medium hyperaccumulates biomass and bioactive compounds in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Algal Research*, Volume 47, 2020, 101872, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101872>
461. Butler, T., Kapoore, R.V. and Vaidyanathan, S. orcid.org/0000-0003-4137-1230 (2020) *Phaeodactylum tricornutum* : a diatom cell factory. *Trends in Biotechnology*, 38 (6). pp. 606-622. ISSN 0167-7799 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023>
462. Corrêa, P.S.; Morais Júnior, W.G.; Martins, A.A.; Caetano, N.S.; Mata, T.M. Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes* 2021, 9, 10. <https://dx.doi.org/10.3390/pr9010010>

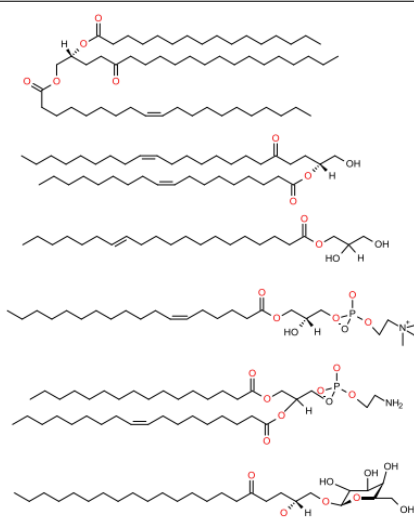
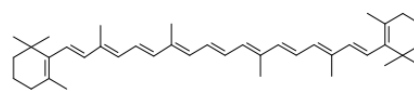
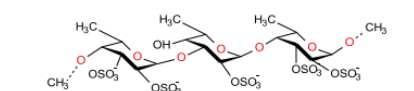
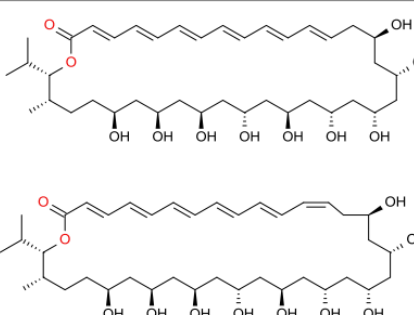
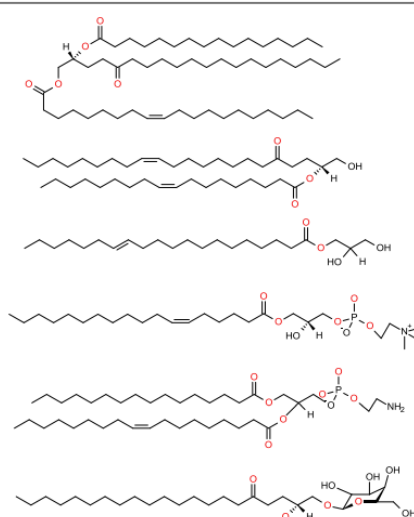
Παραρτήματα

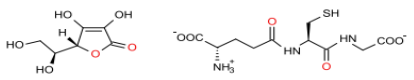
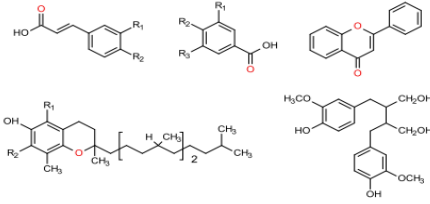
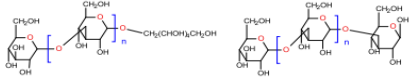
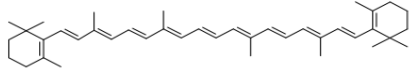
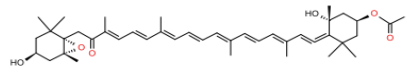
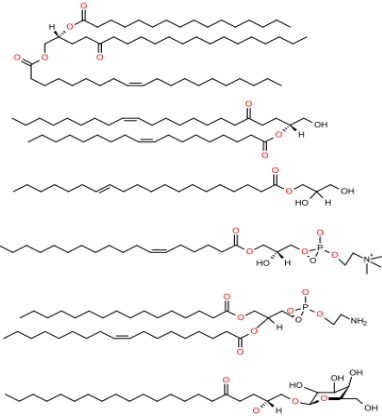
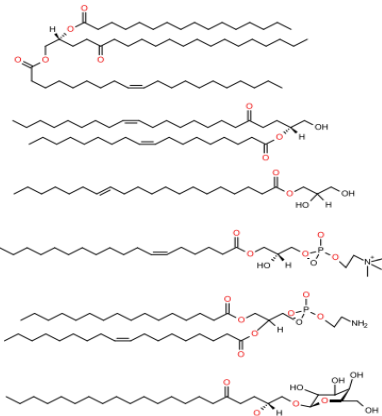
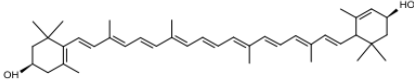
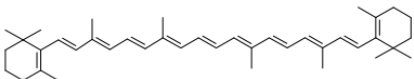
Πίνακας 1: Μικροάλγη και χρήσιμα ιχνοστοιχεία και μέθοδοι εκχύλισης [481]

Table 1. Algal biome as a prolific source of bioactive compounds.			
Algal spp.	Bioactive Compound	Structure	Methodology
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoids (β-carotene), Chlorophyll a and b		SFE, UAE
<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	MC21-A		Solvent extraction methanol
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Antioxidant polysaccharides (sulfated polysaccharides)		EAE
<i>Skeletonema marinoi</i>	Anticonvulsant inosine		Solvent extraction
<i>Chlorella vulgaris</i>	Carotenoids (β-carotene), Chlorophyll a and b		SFE
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin		SFE
<i>Phormidium valderianum</i>	Anatoxin-a		SFE

<i>Algal spp.</i>	Bioactive Compound	Structure	Methodology
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Lutein		Solvent extraction, UAE
<i>Gyrodinium impudium</i>	Sulfated polysaccharide		Solvent extraction
<i>Nannochloropsis spp.</i>	Carotenoids (β-carotene), Chlorophyll a and b		UAE
<i>Chlorella stigmatophora</i> <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Crude polysaccharide extracts		Lyophilized
<i>Scenedesmus sp.</i>	Lipids		SFE

Algal spp.	Bioactive Compound	Structure	Methodology
<i>Gyrodinium impudium</i>	Sulfated polysaccharide		Solvent extraction
<i>Nannochloropsis</i> spp.	Carotenoids (β-carotene), Chlorophyll a and b		UAE
<i>Chlorella stigmatophora</i> , <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	Crude polysaccharide extracts		Lyophilized
<i>Scenedesmus</i> sp.	Lipids		SFE

<i>Algal spp.</i>	Bioactive Compound	Structure	Methodology
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Lipids		UAE
<i>Spirulina platensis</i>	β -carotene		UAE
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoidan		MAE
<i>Streptomyces sp.</i>	Bahamaolides A and B		
<i>Chlorella vulgaris, Scenedesmus dimorphus, and Nannochloropsis sp.</i>	Lipids		EAE

<i>Algal spp.</i>	Bioactive Compound	Structure	Methodology	
<i>Palmaria palmata</i>	L-Ascorbic acid Glutathione		EAE	V
<i>Sargassum muticum</i>	Phenolic compounds		EAE, MAE	P
<i>Laminaria and Saccharina species</i>	Laminarin		Solvent extraction	
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoids (β-carotene)		PLE	
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Fucoxanthin		PLE	I
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Lipids		EAE	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lipids		MAE and SFE	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lutein		UAE	
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Carotenoids (β-carotene)		PLE	

Παράρτημα 2 Πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές των μικροαλγών
σε λειτουργικές τροφές

Πίνακας Π2: Πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές των μικροαλγών σε λειτουργικές τροφές, κατατασσόμενα με βάση τον τύπο τροφίμου, τον εμπορικό τύπο της βιόμαζας και το βιοδραστικό συστατικό (κεφ 7.1) [446]

Microalgae	Food	Commercial Form of Biomass	Bioactive Compound	Health Benefit	
Genus/Species	Product	Sensory Effect			
<i>Chlorella</i> sp. <i>Spirulina</i> sp.	Milk	Improved flavor and mouthfeel	Powder or liquid	Protein, PUFA- ω 3, EPA *, DHA **	Reduced risk of anemia
<i>Arthrospira platensis</i>	Yoghurt	Improved texture and viscosity	Extract	Phycocyanin	Anticancer; antioxidant and anti-inflammatory
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Chlorella</i> sp.	Cheese	Improved texture	Powder	Protein, carbohydrates, PUFA- ω 3	Anticancer; reduced risk of gastric ulcers, constipation, anemia, hypertension, diabetes, infant malnutrition, neurosis
<i>Spirulina</i> sp.	Alcohol-free beverage	Improved color and sour taste	Powder or liquid	Protein, chlorophylls, phycocyanin	Improved immune and lymphatic systems, protection against cancers and ulcers
<i>Arthrospira maxima</i> <i>Chlorella protothecoides</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	Desserts	Improved color and stability	Powder or flour	Protein, vitamins, minerals	Antioxidant activity, prevention of constipation
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Tetraselmis suecica</i>	Cookies and biscuits	Improved color, stability and texture	Powder or flour	Protein, PUFA- ω 3, EPA, DHA, astaxanthin	Antioxidant activity
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Chlorella</i> sp.	Bread and cookies	Improved flavor, texture and appearance	Powder or flour	Protein, vitamins, minerals	Reduced fat and cholesterol levels, induced satiety
<i>Dunaliella</i> sp. <i>Spirulina</i> sp.	Miso	Slightly seaweed taste	Powder	Protein, vitamins, minerals	Antioxidant activity
<i>Chlorella</i> sp. <i>Spirulina</i> sp.	Koji	No flavor or smell	Powder	n.a. ****	Improved immunity and blood pressure
<i>Dunaliella salina</i>	Pasta	Improved color and texture	Powder	Protein, carotenoids	Antioxidant activity
<i>Diacronena volkianum</i> <i>Isochrysis galbana</i>	Pasta	Improved color, flavor, texture and firmness	Powder	Protein, PUFA- ω 3, EPA, DHA, carotenoids	Protection against gastric ulcers, prevention of constipation, reduced anemia and diabetes, improved blood pressure
<i>Arthrospira maxima</i> <i>Diacronena volkianum</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	Vegetarian food gels	Improved color and firmness	Gels	PUFA- ω 3, EPA, DHA, GLA ***, carotenoids	Antioxidant activity
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	Emulsions or vegetarian mayonnaise	Improved color and stability	Oil or emulsions	Protein, carotenoids	Antioxidant activity
<i>Chlorella vulgaris</i>	Soybean oil	Improved color and stability	Oil	Carotenoids	Antioxidant activity
<i>Arthrospira platensis</i>	n.a.	n.a.	Oil	Carotenoids	Antimicrobial and antiviral activities
<i>Dunaliella salina</i>	Culinary condiment with sea salt	Improved flavor	Powder	Carotenoids	Antioxidant activity
<i>Chlorella</i> sp. <i>Schizochytrium</i> sp. <i>Thraustochytrium</i> sp.	Food supplement	n.a.	Powder, flour, tablet or liquid	Proteins, PUFA- ω 3	Prevention of constipation, induction of satiety
<i>Dunaliella</i> sp. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Nannochloris</i> sp. <i>Nannochloropsis</i> sp.	Food supplement	n.a.	Capsules	Protein	n.a.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Food supplement	n.a.	Capsules	Astaxanthin	Improved eye and brain health, UV protection and skin health, anti-coagulatory and anti-inflammatory effects in diabetes, immune system modulation, cardiovascular health
<i>Parietochoris incisa</i>	Food supplement	n.a.	Powder or tablet	ARA ****	n.a.
<i>Tetraselmis suecica</i>	Food supplement	n.a.	Extract	n.a.	Prevention of obesity and diabetes

* EPA—Eicosapentaenoic acid, ** DHA—Docosahexaenoic acid, *** GLA—Gamma-linolenic acid, **** ARA—Arachidonic acid, ***** n.a.—Information not available.

Πίνακας Π3: Πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές των μικροαλγών σε λειτουργικές ζωοτροφές, κατατασσόμενα με βάση τον τύπο ζωοτροφής, τον εμπορικό τύπο της βιομάζας και το βιοδραστικό συστατικό (κεφ 7.1) [446]

Microalgae Genus/Species	Feed		Resulting Food		Commercial Form of Biomass	Bioactive Compound	Health Benefit
	Animal	Product	Product	Sensory Effect			
<i>Schizochytrium</i> sp.	Cow	Meat		n.a. ***	Powder	PUFA- ω 3, EPA *, DHA **	Improved cardiovascular, brain and eye systems
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Spirulina</i> sp.	Piglet	Meat		n.a.	Powder or spray	Cu	Increased nutritional properties
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Isochrysis</i> sp.	Lamb	Meat		Improved color, (not so intense) odor and flavor	Powder	Protein, PUFA- ω 3	Prevention of cardiovascular diseases
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Schizochytrium</i> sp.	Rabbit	Meat		n.a.	Powder	PUFA- ω 3, γ -linolenic acid	Anti-inflammatory activity, increased nutritional properties
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Staurisira</i> sp. <i>Schizochytrium</i> sp.	Chicken	Meat		Improved color (yellowness of flesh, and redness of liver)	Powder or spray	PUFA- ω 3, EPA, DHA	Antibiotic activity, reduced risk of chronic diseases, improved well-being
<i>Chlorella vulgaris</i>	Pekin duck	Meat		Improved color (yellowness of flesh)	Fermented	Protein	Improved immunity
<i>Arthrospira platensis</i> <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Hen	Egg		Improved color (yellow to orange)	Powder or spray	PUFA- ω 3, EPA, DHA, carotenoids	Prevention of cardiovascular diseases, anti-inflammatory, antihypertensive, anticancer, antioxidant, antidepressing and antiaging activities
<i>Porphyridium</i> sp.	White Leghorn chicken	Egg		Improved color (yellow to orange)	Freeze dried	PUFA- ω 3, EPA, DHA, γ -linolenic acid	Improved nutritional properties
<i>Dunaliella</i> sp.	Shrimp	Meat		n.a.	Freeze dried	Carotenoids	Antioxidant activity, improved immunity
<i>Tetraselmis chuii</i>	Shrimp	Meat		n.a.	Freeze dried	Astaxanthin	Antioxidant activity
<i>Nanofrustulum</i> sp. <i>Tetraselmis</i> sp.	Atlantic salmon	Meat		n.a.	Powder	Protein, lipids	Improved nutritional properties
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Salmon and trout	Meat		Improved color	Powder	Astaxanthin	Antioxidant activity
<i>Arthrospira platensis</i>	Coral trout	Meat		n.a.	Pellet	Protein, lipids	Improved nutritional properties and immunity
<i>Arthrospira maxima</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	Koi carp goldfish	Food supplement		Improved color (red hue)	Powder	Carotenoids	Antioxidant activity

* EPA—Eicosapentaenoic acid, ** DHA—Docosahexaenoic acid, *** n.a.—Information not available.

Παράρτημα 3 Συνταγή Brioche και Οργανοληπτικά Μέτρα

Πίνακας Α: Τυπική συνταγή παρασκευής αρτοσκευάσματος τύπου μπριός (brioche) (κεφ 7.2]

Ingredient	Amount (g)
Αλεύρι	600
Νερό	250
Ζύμη	8
Αλάτι	12
Φοικέλαιο	60
Βούτυρο Γάλακτος	60
Ζάχαρη	84
Φρέσκα Αυγά	90
Άρωμα Βανίλιας	2

Πίνακας Β: Χαρακτηριστική της Οργανοληπτικής Ανάλυσης (κεφ 7.2]

Οργανοληπτικά Κριτήρια Αναλυτών	Χαρακτηριστικά
Εμφανισιακά	Υφή
	Αποδοχή χρώματος
	Πορώδες
	Ομογένεια
	Παρουσία νιφάδων, σκληρών υφών
Γεύση	Γεύση και Οσμή
	Mouth feel
	Πλούσια
	Αλμυρή
	Ξινή
	Πικρή
	Γλυκιά
	Βουτύρου
	Ελλιπής Φρεσκάδα
	Αίσθηση βύνης
	Ταγγισμένο
	Καμμένο

Παράρτημα 4 Συνταγές Χυμών, Προδιαγραφές και Περιγραφή Διεργασιών

Πίνακας 1Α: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου-καρότου-πορτοκαλιού (κεφ 7.3]

Προϊόν:		Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			58%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού και καρποκύτταρα			33%
Χυμός Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Καρότου			7%
Χυμός Μαύρου Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μαύρου Καρότου			2%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας Χυμός Καρότου από Καρότα Βοιωτίας			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες			100ml
Ενέργεια			48
Ενέργεια			203
Λιπαρά, g			0
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			11,3
		Σάκχαρα, g	10,6
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,02
Διατροφικά Μερίδια			200 ml
Ενέργεια	kcal		95,6
Ενέργεια	kJ		406
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
Βιταμίνες			/ 100 ml
Προβιταμίνη Α	700μg		15%***
Βιταμίνη C	12 mg		15%
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kJ/2000kcal)			
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς			
*** Λαμβάνοντας υπόψη ότι 6μg προβιταμίνης Α μετατρέπονται σε 1 μg βιταμίνης Α			

Μεριδοποίηση

Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml

Πίνακας 1B: Προδιαγραφές και μέθοδος παστερίωσης χυμού Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο (κεφ 7.3]

Πίνακας Π1B1 Προδιαγραφές και μέθοδος παστερίωσης χυμού Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο.

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ	12 μήνες	BRIX (refr, 20C) ($\pm 0,1$)	11,7
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	1 Lit ASEPTIC TETRABRIK	ACIDITY w/v % AS CAA, at pH: 8,1	0,35 \pm 0,01
ΔΟΣΕΙΣ	1	pH:	< 4,2
Θ (C ⁰) ΠΑΣΤΕΡ.	93 ⁰ C, 30s	VITAMIN C, mg/l	500-600
D 20/20	1,047	Total Aerobic Count	Max 10 cfu /g

Οι παραπάνω προδιαγραφές καθώς και οι συνθήκες παστερίωσης εφαρμόζονται τόσο στο συμβατικό προϊόν όσο και σε όλες τις εκδόσεις με ασταξανθίνη. Ωστόσο αν και τα τεχνικά χαρακτηριστικά του χυμού με EPA & DHA παραμένουν ίδια με αυτά του συμβατικού προϊόντος έχουμε μικρή μείωση στη θερμοκρασία παστερίωσης αναφορικά με τα στοιχεία επεξεργασίας και αναμένουμε μικρότερο χρόνο ζωής

Πίνακας Π1B2 Προδιαγραφές και μέθοδος παστερίωσης χυμού Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο, EPA,DHA

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ	10 μήνες	BRIX (refr, 20C) ($\pm 0,1$)	11,7
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	1 Lit ASEPTIC TETRA BRIK	ACIDITY w/v % AS CAA, at pH: 8,1	0,35 \pm 0,01
ΔΟΣΕΙΣ	1	pH:	< 4,2
Θ (C ⁰) ΠΑΣΤΕΡ.	92 ⁰ C, 30s	VITAMIN C, mg/l	500-600
D 20/20	1,047	T.COUNT	Max 10 cfu /g

Πίνακας 1C: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου-καρότου-πορτοκαλιού με Ασταξανθίνη0,1 (κεφ 7.3]

Προϊόν:		Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			58%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού και καρποκύτταρα			33%
Χυμός Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Καρότου			6,9%
Χυμός Μαύρου Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μαύρου Καρότου			2%
Ασταξανθίνη			0,1%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας Χυμός Καρότου από Καρότα Βοιωτίας			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες			100ml
Ενέργεια			48
Ενέργεια			203
Λιπαρά, g			0
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			11,3
		Σάκχαρα, g	10,6
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,02
Διατροφικά Μερίδιας			200 ml
Ενέργεια	kJ		95,6
Ενέργεια	kJ		406
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
Βιταμίνες		/ 100 ml	%ΔΤΑ**
Προβιταμίνη Α	700μg		15%***
Βιταμίνη C	12 mg		15%
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kJ/2000kcal)			
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς			
*** Λαμβάνοντας υπόψη ότι 6μg προβιταμίνης Α μετατρέπονται σε 1 μg βιταμίνης Α			
Μερίδοποίηση			
Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml			

Πίνακας 1D: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου-καρότου-πορτοκαλιού με Ασταξανθίνη0,15 (κεφ 7.3]

Προϊόν:		Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			58%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού και καρποκύτταρα			33%
Χυμός Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Καρότου			6,85%
Χυμός Μαύρου Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μαύρου Καρότου			2%
Ασταξανθίνη			0,15%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας Χυμός Καρότου από Καρότα Βοιωτίας			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες		100ml	
Ενέργεια			48
Ενέργεια			203
Λιπαρά, g			0
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			11,3
		Σάκχαρα, g	10,6
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,02
Διατροφικά Μέρηδες		200 ml	
Ενέργεια	kJ		95,6
Ενέργεια	kJ		406
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
Βιταμίνες		/ 100 ml %ΔΤΑ**	
Προβιταμίνη Α	700μg		15%***
Βιταμίνη C	12 mg		15%
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kJ/2000kcal)			
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς			
*** Λαμβάνοντας υπόψη ότι 6μg προβιταμίνης Α μετατρέπονται σε 1 μg βιταμίνης Α			
Μερίδοποίηση			
Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml			

Πίνακας 1Ε: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου-καρότου-πορτοκαλιού με EPA,DHA (κεφ 7.3]

Προϊόν:		Μήλο-Πορτοκάλι-Καρότο με EPA, DHA	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			58%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού και καρποκύτταρα			33%
Χυμός Καρότου από Συμπυκνωμένο Χυμό Καρότου			6%
Εκχύλισμα EPA, DHA			3%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας Χυμός Καρότου από Καρότα Βοιωτίας Εκχύλισμα Ω3 από P Tricornotum			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες			100ml
Ενέργεια			49
Ενέργεια			208
Λιπαρά, g			0,13
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			11,3
		Σάκχαρα, g	10,6
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,02
Διατροφικά Μερίδιας			200 ml
Ενέργεια	kcal		97,94
Ενέργεια	kj		415
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
Βιταμίνες			/ 100 ml
Προβιταμίνη Α	700μg		15%***
Βιταμίνη C	12 mg		15%
Ω3 Λιπαρά Οξέα			/ 100 ml
EPA και DHA	25 mg		100%
(DHA and EPA contributes to the normal function of the heart, to maintainance of normal brain function)			
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kj/2000kcal)			
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς			
*** Λαμβάνοντας υπόψη ότι 6μg προβιταμίνης Α μετατρέπονται σε 1 μg βιταμίνης Α			
Μερίδοποίηση			
Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml			

Πίνακας 2Α: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου, πορτοκαλιού, μανταρινιού, βερίκοκου (κεφ 7.3]

Όνομα		Μήλο-Πορτοκάλι- Μανταρίνι-Βερίκοκο	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			62%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού			20%
Χυμός Μανταρινιού από Συμπυκνωμένο Χυμό Μανταρινιού			8%
Πουρέ Βερίκοκου			10%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς			
Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας			
Χυμός Μανταρινιού από Μανταρίνια Αργολίδας			
Πουρέ Βερίκοκου από Βερίκοκα Αργολίδας, Κορινθίας			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες			100ml
Ενέργεια			50
Ενέργεια			215
Λιπαρά, g			0
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			12
		Σάκχαρα, g	10,8
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,01
Διατροφικά Μερίδια			200 ml
Ενέργεια	kcal		99,2
Ενέργεια	kJ		430
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
			%ΔΤΑ
Βιταμίνες			**
/ 100 ml			
Βιταμίνη C	12 mg		15%
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kJ/2000kcal)			
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς			

Μερίδοποίηση

Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml

Πίνακας 2B: Προδιαγραφές και μέθοδος παστερίωσης χυμού μήλου, πορτοκαλιού, μανταρινιού, βερικόκου (κεφ 7.3]

ΗΜΕΡ. ΛΗΞΗΣ	12 μήνες	BRIX, +/- 0,1	12,5
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	1 Lit ASEPTIC TETRA BRIK	ACIDITY % AS CAA	0,40 ± 0,01
ΔΟΣΕΙΣ	1	Ph	< 4,0
Θ (C ⁰) ΠΑΣΤΕΡ.	95 ⁰ C, 30s	ASCORBIC ACID, ppm	> 400 < 600
PULP (1500RPM) %	10-30	T.COUNT	Max 10 cfu / g
		D _{20/20}	1,05048

Οι παραπάνω προδιαγραφές καθώς και οι συνθήκες παστερίωσης εφαρμόζονται για όλες τις εκδόσεις

Πίνακας 2C: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου, πορτοκαλιού, μανταρινιού, βερικόκου με Ασταξανθίνη0,1 (κεφ 7.3]

Όνομα		Μήλο-Πορτοκάλι- Μανταρίνι-Βερίκοκο
Συστατικά		
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου		62%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού		20%
Χυμός Μανταρινιού από Συμπυκνωμένο Χυμό Μανταρινιού		7,9%
Πουρέ Βερίκοκου		10%
Ασταξανθίνη		0,1%
Περιεκτικότητα σε Χυμό		100%
Καταγωγή-Προέλευση		
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς		
Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας		
Χυμός Μανταρινιού από Μανταρίνια Αργολίδας		
Πουρέ Βερίκοκου από Βερίκοκα Αργολίδας, Κορινθίας		
Διατροφικά Στοιχεία		
Διατροφικές Πληροφορίες		100ml
Ενέργεια		50
Ενέργεια		215
Λιπαρά, g		0
	κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g		12
	Σάκχαρα, g	10,8
Εδώδιμες Ίνες, g		0,5
Πρωτεΐνες, g		0,4
Αλάτι, g		0,01
Διατροφικά Μερικά		200 ml
Ενέργεια	kcal	99,2
Ενέργεια	kJ	430
Ενέργεια		5% ΠΠΑ*
		%ΔΤΑ
Βιταμίνες		**
Βιταμίνη C		/ 100 ml
	12 mg	15%
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kJ/2000kcal)		
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς		

Μερίδοποίηση

Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml

Πίνακας 2D: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου, πορτοκαλιού, μανταρινιού, βερίκοκου με Ασταξανθίνη0,15(κεφ 7.3]

Όνομα		Μήλο-Πορτοκάλι- Μανταρίνι-Βερίκοκο
Συστατικά		
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου		62%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού		20%
Χυμός Μανταρινιού από Συμπυκνωμένο Χυμό Μανταρινιού		7,85%
Πουρέ Βερίκοκου		10%
Ασταξανθίνη		0,15%
Περιεκτικότητα σε Χυμό		100%
Καταγωγή-Προέλευση		
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς		
Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας		
Χυμός Μανταρινιού από Μανταρίνια Αργολίδας		
Πουρέ Βερίκοκου από Βερίκοκα Αργολίδας, Κορινθίας		
Διατροφικά Στοιχεία		
Διατροφικές Πληροφορίες		100ml
Ενέργεια		50
Ενέργεια		215
Λιπαρά, g		0
	κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g		12
	Σάκχαρα, g	10,8
Εδώδιμες Ίνες, g		0,5
Πρωτεΐνες, g		0,4
Αλάτι, g		0,01
Διατροφικά Μερίδας		200 ml
Ενέργεια	kcal	99,2
Ενέργεια	kJ	430
Ενέργεια		5% ΠΠΑ*
		%ΔΤΑ
Βιταμίνες	/ 100 ml	**
Βιταμίνη C	12 mg	15%

* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kj/2000kcal)

**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς

Μερίδοποίηση

Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml

Πίνακας 2Ε: Τυπική συνταγή παρασκευής χυμού φρούτων μήλου, πορτοκαλιού, μανταρινιού, βερίκοκου με EPA,DHA (κεφ 7.3]

Όνομα		Μήλο-Πορτοκάλι-Μανταρίνι-Βερίκοκο, EPA, DHA	
Συστατικά			
Χυμός Μήλου από Συμπυκνωμένο Χυμό Μήλου			60%
Χυμός Πορτοκάλι από Συμπυκνωμένο Χυμό Πορτοκαλιού			20%
Χυμός Μανταρινιού από Συμπυκνωμένο Χυμό Μανταρινιού			7%
Πουρέ Βερίκοκου			10%
Εκχύλισμα EPA DHA			3%
Περιεκτικότητα σε Χυμό			100%
Καταγωγή-Προέλευση			
Χυμός Μήλου από Μήλα Πέλλας, Ημαθίας, Καστοριάς			
Χυμός Πορτοκαλιού από Πορτοκάλια Αργολίδας, Λακωνίας			
Χυμός Μανταρινιού από Μανταρίνια Αργολίδας			
Πουρέ Βερίκοκου από Βερίκοκα Αργολίδας, Κορινθίας			
Εκχύλισμα Ω3 από P Tricornotum			
Διατροφικά Στοιχεία			
Διατροφικές Πληροφορίες			100ml
Ενέργεια			51
Ενέργεια			220
Λιπαρά, g			0,13
		κορεσμένα, g	0
Υδατάνθρακες, g			12
		Σάκχαρα, g	10,8
Εδώδιμες Ίνες, g			0,5
Πρωτεΐνες, g			0,4
Αλάτι, g			0,01
Διατροφικά Μερίδας			200 ml
Ενέργεια	kJ		101,54
Ενέργεια	kcal		439
Ενέργεια		5%	ΠΠΑ*
Βιταμίνες	/ 100 ml		%ΔΤΑ**

Βιταμίνη C	12 mg	15%
Ω3 Λιπαρά Οξέα	/ 100 ml	%ΔΤΑ**
EPA και DHA	25 mg	100%
(DHA and EPA contributes to the normal function of the heart, to maintainance of normal brain function)		
* ΠΠΑ = Προσλαμβανόμενη ποσότητα αναφοράς ενός μέσου ενήλικα (8400kj/2000kcal)		
**ΔΤΑ = Διατροφική Τιμή Αναφοράς		

Μερίδοποίηση
Κάθε συσκευασία 1 Λ = 5 ποτήρια (μερίδες) των 200ml

PRODUCT SHELF LIFE TEST Dictated and approved by: M.Chronis

Product: Μήλο-Καρότο-Πορτοκάλι, Ασταξ 0,1% Completed: 15.12.2015

Product Code: ΜΚΠΑΞ Revision no.: 000

Test ID Number: 153335ΜΚΠΑΞ Warehouse Code:

1. PRODUCT DESCRIPTION

Light yellow colour, three fruit juice with strong fresh flavour of 100% Greek apples, oranges and carrots with the addition of 0.1% astaxanthin, , packed in aseptic packages (similar to TBA A3 Flex machine) and pasteurized at laboratory pasteurizer.

2. OBJECTIVE

Determination of the shelflife of the product that is going to be traded through the Retail Chain subjected to chilled chain conditions. The test will include examination of all sensory, physicochemical and microbiological parameters during optimum, typical and worst case conditions. The plan is shown in the following table 5.1, 5.2, 5.3.

3. STORAGE CONDITIONS

The storage and transportation conditions are most affected by the temperature range as described in the following table 3.1:

TABLE 3.1

Optimum Conditions : 7-8 °C

Typical or Average Conditions : 7-15°C

Worst Case Conditions : > 10°C or <0°C

4. SAMPLING SCHEDULE

Samples of the testing product must be taken in such a way to represent all stages of production. At our case the samples are taken every 10 minutes to cover the evolution of the pasteurizing cycle and the remaining time of the product in the blending vessel. One complete batch cycle lasts for two hours, which means that there is product that stays form more than two under non aseptic conditions. Sampling methodology is described into the following table 4.1.

Table 4.1 Product	Sampling Point	Sample Volume	Sampling Interval
ΜΚΠΑΞ	Exit of filler	14 boxes	50 minutes (3 samples at time 0, time1, time 2)

5. SAMPLE ANALYSIS

The product is analysed in the company's central quality control department under the guidelines of the quality manual and the approved methods of analyses. The test is applied for the scope of 12 months shelf life and the product quality is evaluated against not only its standard specifications but also against fresh sample of the same material. The time evolution is simulated by placing the product in incubators at 37°C. Each day counts for a month of real storage. Score scale is as following:

1. Fail: the product does not meet the quality requirements
2. Re-evaluation: A new shelflife test has to executed to judge with better satisfactions
3. Pass: the product meets all its quality requirement

The sensory evaluation team should not be changed for the same product if not necessary.

The results of the tests are shown in the tables 5.1, 5.2, 5.3

Table 5.1: Test for MPKAξ **Sampling Date** **3/12/2015**
the sample at time

0 Product Description											
Sample ID	Date of test	Brix	Acidity as g/kg caa	pH 3.75-3.85	Ascorbic Acid 120-130ppm	Total count - 0 5d(zerv)	Box Blown	Mouth feeling	Taste	Flavour	Month Test Assay(M E)
24760 810/50 0/01	04/12/15	11.85	0.30	3.81	129	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month1
24760 810/50 0/02	05/12/15	11.85	0.31	3.82	128	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month2
24760 810/50 0/03	06/12/15	11.85	0.31	3.80	128	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month3
24760 810/50 0/04	07/12/15	11.84	0.30	3.78	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month4
24760 810/50 0/05	08/12/15	11.85	0.30	3.79	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month5
24760 810/50 0/06	09/12/15	11.83	0.31	3.80	126	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month6
24760 810/50 0/07	10/12/15	11.85	0.30	3.80	126	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month7
24760 810/50 0/08	11/12/15	11.88	0.31	3.80	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month8
24760 810/50 0/09	12/12/15	11.85	0.31	3.79	126	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month9
24760 810/50 0/10	13/12/15	11.84	0.30	3.79	126	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month10
24760 810/50 0/11	14/12/15	11.85	0.30	3.81	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month11
24760 810/50 0/12	15/12/15	11.85	0.30	3.82	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month12
Test Conclusion	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

Table 5.3: Test for MPKAξ **Sampling Date** **3/12/2015**
the sample at time

2 Product Description											
Sample ID	Date of test	Brix 12.6 +/- 1	Acidity as g/kg caa	pH 3.75-3.85	Ascorbic Acid 120-130ppm	Total count - 0 5d(zerv)	Box Blown	Mouth feeling	Taste	Flavour	Month Test Assay
24760 940/50 2/01	04/12/15	11.83	0.31	3.82	129	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month1
24760 940/50 2/02	05/12/15	11.84	0.31	3.81	128	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month2
24760 940/50 2/03	06/12/15	11.84	0.31	3.81	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month3
24760 940/50 2/04	07/12/15	11.86	0.30	3.80	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month4

24760 940/50 2/05	08/12/1 5	11.85	0.33	3.79	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month5
24760 940/50 2/06	09/12/1 5	11.88	0.31	3.80	127	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month6
24760 940/50 2/07	10/12/1 5	11.86	0.32	3.80	126	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month7
24760 940/50 2/08	11/12/1 5	11.83	0.31	3.83	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month8
24760 940/50 2/09	12/12/1 5	11.85	0.31	3.79	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month9
24760 940/50 2/10	13/12/1 5	11.85	0.30	3.80	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month10
24760 940/50 2/11	14/12/1 5	11.88	0.29	3.81	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month11
24760 940/50 2/12	15/12/1 5	11.85	0.33	3.82	125	0	Pass	Pass	Pass	Pass	Month12
Test Conclu sion	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

Thus the final conclusion is that the product has **PASSED** the 12 months shelflife test. Prepared by R&D manager Tasos Bolosis

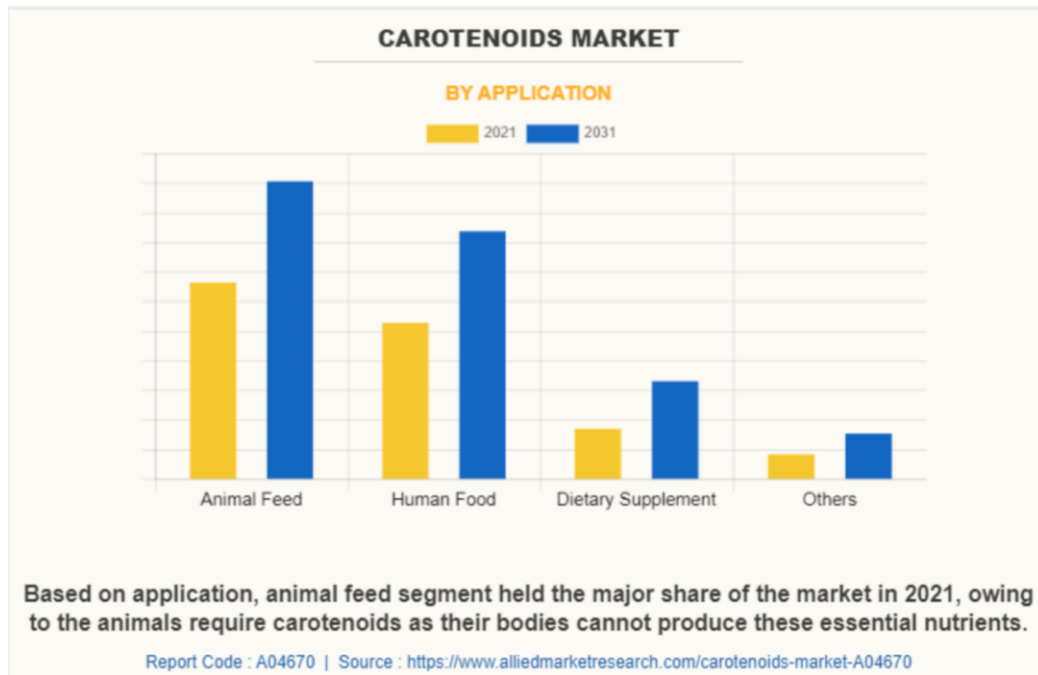
Controlled by QC Manager

A.Sarris

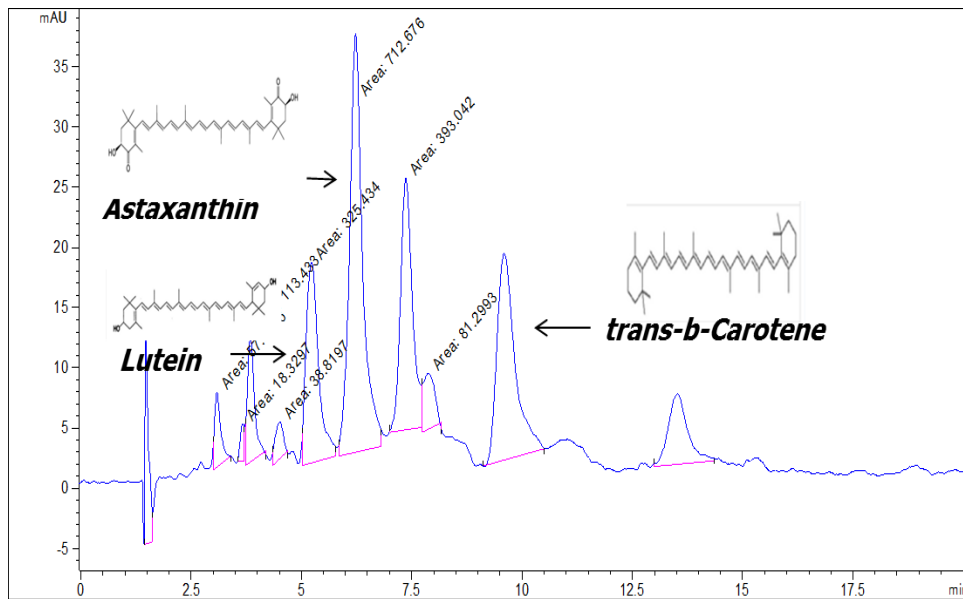
Approved by QA director

Mario Chronis

Παράρτημα 5 Εμπορικές Κατηγορίες Εφαρμογής Καροτενοειδών

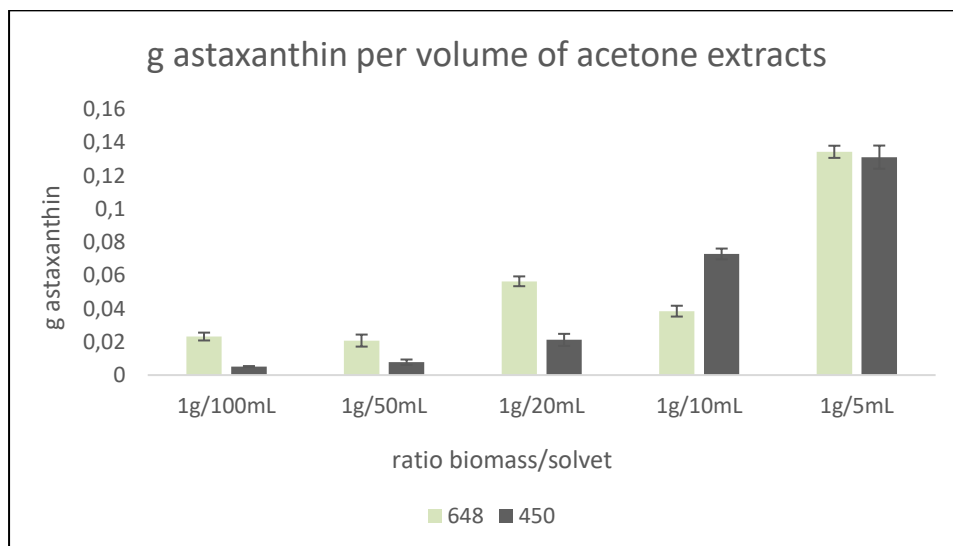


Παράρτημα 6 Ανάλυση ακετονικού εκχυλίσματος με HPLC-Cad του *H. Pluvialis*



Διάγραμμα 11. Ανάλυση HPLC ακετονικού εκχυλίσματος *H. Pluvialis*

Παράρτημα 7 Εκχύλιση αναφοράς Ασταξανθίνης με ακετόνη

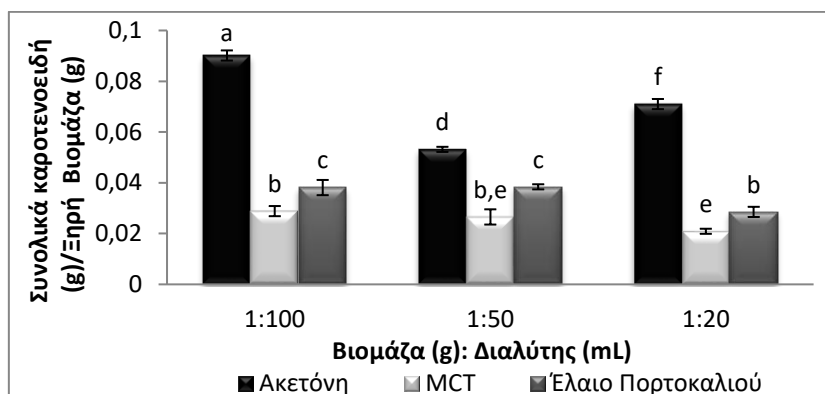


Διάγραμμα 12. Διάγραμμα ακετονικά εκχυλίσματα αναφοράς για ασταξανθίνη

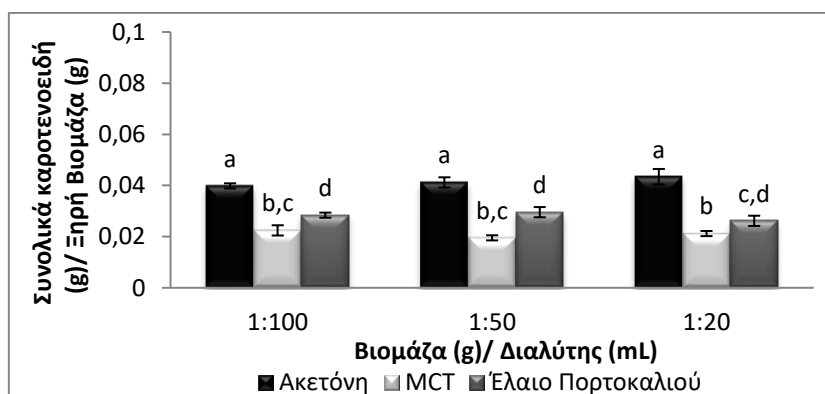
Παράρτημα 8 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου *H. pluvialis*

Fatty acids	Retention time	Fatty acids	Retention time	Fatty acids	Retention time
C14:0 Myristic	4.829	C18:0 Stearic	13.439	C20:0 arachidic	18.4
C16:0 Palmitic	8.693	C18:1 ω9 Oleic	13.998	C20:1 ω9 Gadoleic	18.838
C16:1 ω7 Palmitoleic	9.139	C18:1 ω7	14.099	C20:2 ω9 Eicosadienoic	20.089
C16:3 ω3 Hexadecatrienoic (HTA)	10.027	C18:2 ω6 Linoleic	15.209	C21:0 Heneicosanoic	20.876
C17:0 Margaric	10.749	C18:3 ω6 gamma Linoleic	15.808	C20:4 ω6 Arachidonic (ARA)	21.377
C17:1 Margaroleic	11.666	C18:3 ω3 Linoleic (ALA)	16.905	C20:5 ω3 Eicosapentaenoic (EPA)	23.149
C16:4 ω3	12.493	C18:4 ω3 Octadecatetraenoic	17.562	C22:1 ω9 13-docosenoic	23.906

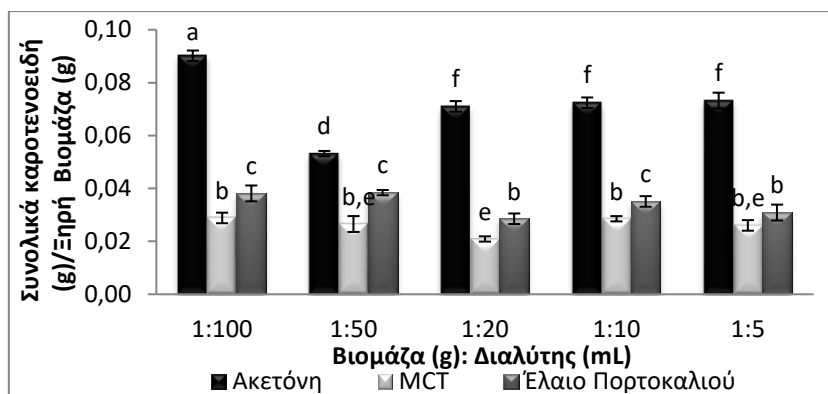
Παράρτημα 9 Συνολικά Καροτενοειδή σε εκχύλιση με διαφορετικούς διαλύτες και υπερήχους σε 648W και 450W του φύκου *H.pluvialis*



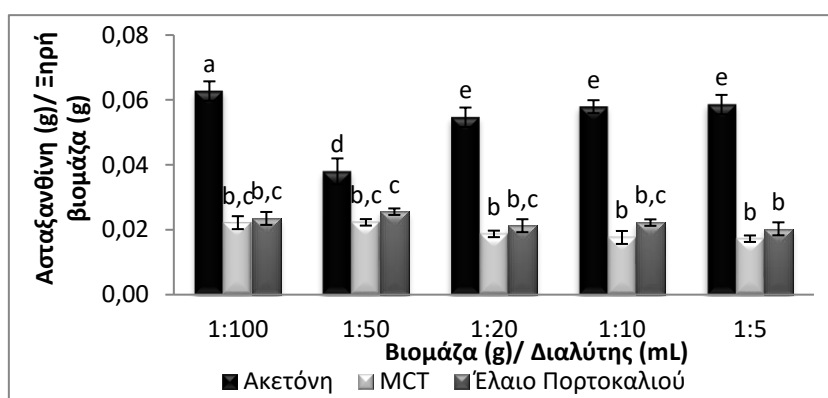
Διάγραμμα 13. Συνολικά καροτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20) στα 648 W.



Διάγραμμα 14. Διάγραμμα: Συνολικά καροτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20) στα 450 W.



Διάγραμμα 15. Συνολικά καροτενοειδή ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) στα 648 W.



Διάγραμμα 16. Ασταξανθίνη ως προς την αρχική ξηρή βιομάζα εκχύλισης σε διαφορετικές αναλογίες βιομάζας :διαλύτη (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) στα 648 W

Παράρτημα 10 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου *H.pluvialis*

Πίνακας 39. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του φύκου *H.pluvialis*

Fatty acids	Retention time	Fatty acids	Retention time	Fatty acids	Retention time
C14:0 Myristic	4.829	C18:0 Stearic	13.439	C20:0 arachidic	18.4
C16:0 Palmitic	8.693	C18:1 ω9 Oleic	13.998	C20:1 ω9 Gadoleic	18.838
C16:1 ω7 Palmitoleic	9.139	C18:1 ω7	14.099	C20:2 ω9 Eicosadienoic	20.089
C16:3 ω3 Hexadecatrienoic (HTA)	10.027	C18:2 ω6 Linoleic	15.209	C21:0 Heneicosanoic	20.876
C17:0 Margaric	10.749	C18:3 ω6 gamma Linoleic	15.808	C20:4 ω6 Arachidonic (ARA)	21.377
C17:1 Margaroleic	11.666	C18:3 ω3 Linoleic (ALA)	16.905	C20:5 ω3 Eicosapentaenoic (EPA)	23.149
C16:4 ω3	12.493	C18:4 ω3 Octadecatetranoid	17.562	C22:1 ω9 13- docosenoic	23.906

Παράρτημα 11 Λιπαρά Οξέα *Phaeodactylum tricornutum*

Πίνακας 40. Προφίλ Λιπαρών Οξέων *Phaeodactylum tricornutum*

Λιπαρά οξέα	Rt (min)	mg/g ξηρής βιομάζας	Λιπαρά οξέα	Rt (min)	mg/g ξηρής βιομάζας
15:1	7.23	0,65	20:2 ω9 Eicosadienoic	20.815	2,85
16:0 Palmitic	8.92	21,08	20:4 ω3	22.389	3,00
16:1ω9	9.53	2,52	20:5 ω3 Eicosapentaenoic (EPA)	22.696	26,90
16:3 ω3	10.120	3,22	22:5 ω6	27.803	1,23
17:0 Margaric	11.018	11,57	22:6 ω3 (DHA)	28.408	0,80
18:0 Stearic	13.412	2,59	Σύνολο λιπαρών οξέων		76,46
18:2 ω6 Linoleic	15.443	1,80	Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων		42,35

Πίνακας 41. Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*

Προφίλ πολυακόρεστων λιπαρών οξέων	mg/g βιομάζας	% Συνόλου λιπαρών οξέων
ω3	33,93	44,38
Εκ των οποίων Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA)	26,90	35,19
Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	0,80	1,03
ω6	3,04	3,98
ω9	5,37	7,03
Σύνολο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων	42,35	-