



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In vitro ανοσορυθμιστικές και αντυπερτασικές ιδιότητες μικροφυκών και καινοτόμου προϊόντος επιδορπίου γιαουρτιού εμπλουτισμένο με συστατικά της *Spirulina platensis*



Αγγελική Μ. Σαββίδου

Επιβλέπων καθηγητής:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In vitro ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες μικροφυκών και καινοτόμου προϊόντος επιδορπίου γιαουρτιού εμπλουτισμένο με συστατικά της *Spirulina platensis*

“*In vitro* immunomodulatory and antihypertensive properties of microalgae and innovative yoghurt dessert product fortified with *Spirulina platensis* components”

Αγγελική Μ. Σαββίδου

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος Κατσαρός, Ερευνητής Β' ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Αιμιλία Παπακωνσταντίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

In vitro* ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες μικροφυκών και καινοτόμου προϊόντος επιδορπίου γιαουρτιού εμπλουτισμένο με συστατικά της *Spirulina platensis

ΔΠΜΣ «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας

Περίληψη

Τα «λειτουργικά τρόφιμα» παρουσιάζουν αυξημένη ζήτηση τα τελευταία χρόνια. Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα μικροφύκη, προσελκύνουν το ενδιαφέρον του κλάδου των τροφίμων καθώς πέρα από την υψηλή θρεπτική τους αξία, περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών ουσιών που ασκούν δράσεις όπως αντιυπερτασική, ανοσορυθμιστική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική κ.α. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, επιφέρουν επίσης πολλαπλά οφέλη για την υγεία μέσω βιοενεργών πεπτιδίων που προέρχονται από τις πρωτεΐνες τους. Συνεπώς, η ενσωμάτωση των μικροφυκών σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γιαούρτι, πιθανόν να αποτελέσει μια πολλά-υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη καινοτόμων τροφίμων με βελτιωμένο διατροφικό προφίλ και θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αξιολογήθηκαν οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) που απομονώθηκαν ύστερα από *in vitro* προσομοίωση πέψης των μικροφυκών *Arthrospira (Spirulina) platensis* και *Chlorella vulgaris* με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (Fe) (61 mg Fe /L και 183 mg Fe /L), καθώς και ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες καινοτόμων προϊόντων επιδορπίου γιαουρτιού εμπλουτισμένων με βιομάζα/ πρωτεϊνικό εκχύλισμα της *Spirulina platensis* (YSB/YSE) και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά του μικροφύκου (YL). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων σιδήρου των μικροφυκών στη διαλυτότητα του Fe.

Η ανοσορυθμιστική δράση των πεπτιδίων προσδιορίστηκε από τη σχετική έκφραση μιας σειράς γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης, με την τεχνική qPCR, από διαφοροποιημένα και διεγερμένα με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) THP-1 κύτταρα που εκτέθηκαν στα πεπτίδια. Οι αντιυπερτασικές ιδιότητες προσδιορίστηκαν από την ικανότητα των πεπτιδίων να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου ACE (Angiotensin-Converting Enzyme). Τέλος, η διαλυτότητα του σιδήρου (Fe) στα δείγματα μικροφυκών προσδιορίστηκε από τη μέτρηση της συγκέντρωσης δισθενούς σιδήρου (Fe²⁺) σε αυτά, με τη μέθοδο της φερροζίνης.

Τα βασικά ευρήματα έδειξαν πως η *Spirulina platensis* με 183 mg Fe/L επάγει την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων μέσω έκφρασης της ισχυρά αντί-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10, των γονιδίων TNF- α , IL-6, MCP-1 και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Αντιθέτως, η μείωση στην έκφραση της IL-10 με την αύξηση της συγκέντρωσης του Fe στη *Chlorella vulgaris*, υποδεικνύει μειωμένη απόκριση των κυττάρων στη φλεγμονή. Τα δείγματα επιδορπίων γιαουρτιού YSB και YSE εκδήλωσαν πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση μέσω μείωσης της έκφρασης του παράγοντα TGF- β , ενώ το δείγμα YL προκάλεσε προ-φλεγμονώδη απόκριση ενισχύοντας την έκφραση της προ-φλεγμονώδους IL-1 β συγκριτικά με το γιαούρτι μάρτυρα (YC). Όσον αφορά τις αντιυπερτασικές ιδιότητες, όλα τα υπό μελέτη δείγματα έδειξαν υψηλή ACE-ανασταλτική δράση. Ωστόσο στα δείγματα YSB και YSE παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της ACE-ανασταλτικής δράσης σε σχέση με τα δείγματα. YC, PSB και PSE Τέλος, ο εμπλουτισμός με Fe και για τα δύο είδη μικροφυκών φάνηκε να μειώνει σημαντικά τη διαλυτότητά του.

Συνεπώς, η *Spirulina platensis* μπορεί να αποτελέσει πηγή βιοενεργών ουσιών και να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό βιολειτουργικών προϊόντων που προάγουν την υγεία. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία ώστε να διερευνηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός δράσης των

βιοενεργών ουσιών καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των μικροφυκών με τα συστατικά των τροφίμων.

Επιστημονική περιοχή: Βιολειτουργικές Ιδιότητες Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: μικροφύκη, γιαούρτι, *in vitro* πέψη, βιοενεργά πεπτίδια, ανοσορυθμιστικά, αναστολή-ACE, σίδηρος

In vitro* immunomodulatory and antihypertensive properties of microalgae and innovative yoghurt dessert product fortified with *Spirulina platensis

MSc “Integrated Production Management of Milk and Dairy Products”

Department of Food Science and Human Nutrition

Department of Animal Science

Laboratory of Animal Breeding & Husbandry

Abstract

In recent years “functional foods” has been in great demand. Photosynthetic microorganisms, such as microalgae, are attracting increasing attention as in addition to their nutritional value, they contain bioactive compounds that may exert functions such as antihypertensive, immunoregulatory, anticancer, antioxidant etc. Fermented dairy products, also provide health benefits through bioactive peptides encrypted in their proteins.

In this context, incorporation of microalgae into dairy products, such as yoghurt, may have a potential to develop innovative food products with improved nutritional profile and positive effects on human health.

The objective of this study was to evaluate the immunoregulatory properties of peptide fractions (0-3 kDa) isolated after *in vitro* digestion of microalgae *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris* with different iron (Fe) concentrations (61 mg Fe /L και 183 mg Fe /L), as also immunoregulatory and antihypertensive properties of some innovative yoghurt dessert products enriched with *Spirulina platensis* biomass/protein extract (YSB/YSE) and yoghurt dessert with partial replacement of dairy fat with fatty components of the microalgae (YL). In addition, the effect of different microalgae iron concentrations on Fe solubility was studied. The immunoregulatory activity of peptides was determined by relative expression of genes and transcription factors related to the induction of immune responses by qPCR, from LPS-treated and differentiated THP-1 cells exposed to peptides. Antihypertensive properties were determined by the ability of peptides to inhibit the action of angiotensin-converting enzyme (ACE). Finally, the solubility of iron in microalgae samples was determined by measuring the concentration of divalent iron in them, by ferrozine assay.

According to the results, *Spirulina platensis* with 183 mg Fe/L induces the immune response of cells through the expression of anti-inflammatory cytokine IL-10, genes TNF- α , IL-6, MCP-1 and the transcription factor NF- κ B. In contrast, decrease in IL-10 expression with increasing Fe concentration of *Chlorella vulgaris* indicates a reduced cellular response to inflammation. YSB and YSE samples exhibited potential anti-inflammatory activity by inducing the expression of TGF- β , while the YL sample induced pro-inflammatory response by enhancing the expression of pro-inflammatory IL-1 β compared to the control yoghurt (YC). Regarding antihypertensive properties, all studied samples showed high ACE-inhibitory activity. However, in YSB and YSE samples a statistically significant decrease in ACE-inhibitory activity was observed relative to samples YC, PSB and PSE. Finally, Fe enrichment for both microalgae species appeared to reduce its solubility.

Consequently, *Spirulina platensis* may constitute a source of bioactive substances and a suitable ingredient in bio-functional health-promoting food products. Further research is needed to investigate more the mechanism of action of bioactive compounds, as well as interactions of microalgae with food compounds.

Scientific area: Bio-functional Properties of Foods

Keywords: microalgae, yoghurt, *in vitro* digestion, bioactive peptides, immunoregulatory, ACE-inhibition, iron

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, ΣΑΒΒΙΔΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων» των Τμημάτων Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οποιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού. Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

ΣΑΒΒΙΔΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων» των συνεργαζόμενων τμημάτων Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κο Θεοδώρου Γεώργιου.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Θεοδώρου Γεώργιο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για άλλη μια φορά και μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, για τη συνεχή καθοδήγηση, τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές, καθώς και για το ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κο Γεώργιο Κατσαρό και κα Αιμιλία Παπακωνσταντίνου που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στη διδάκτορα Ελένη Νταλάκα, για την καθοριστική συνεισφορά της στην διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, τις πολύτιμες επισημάνσεις της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, τη μετάδοση των γνώσεών της, τη συνεχή καθοδήγηση καθώς και για την υπομονή, την αισιοδοξία της και τις μοναδικές εργαστηριακές μας στιγμές. Ένα ευχαριστώ οφείλω στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Στέφο Γεώργιο για τη μετάδοση των γνώσεών του ιδιαίτερα όσον αφορά τον τρόπο εργασίας σε έναν εργαστηριακό χώρο, καθώς και για τη σημαντική συνεισφορά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων προσδιορισμού διαλυτότητας του σιδήρου.

Ευχαριστώ επίσης τους προπτυχιακούς φοιτητές και συνεργάτες Μπεκιάρη Ντένια, Λύτρα Γρηγόρη και Πέππα Μαριζώη για την βοήθειά τους στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και όλο το στενό μου κύκλο για την απαραίτητη υποστήριξή τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Σας ευχαριστώ!

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| Κατάλογος Πινάκων | 5 |
| Κατάλογος Διαγραμμάτων | 6 |
| Κατάλογος Εικόνων | 7 |
| Κατάλογος Σχημάτων | 9 |
| Κεφάλαιο 1^ο | 10 |
| Εισαγωγή | 11 |
| 1.1. Το Ανοσοποιητικό Σύστημα | 11 |
| 1.1.1. Έμφυτη και ειδική ανοσία | 11 |
| 1.1.2. Μονοκύτταρα- Μακροφάγα | 12 |
| 1.1.3. Κυτοκίνες..... | 13 |
| 1.1.4. Μονοπάτια παραγωγής και δράση κυτοκινών και ανοσορυθμιστικών παραγόντων | 13 |
| 1.1.4.1. Μονοπάτια παραγωγής κυτοκινών | 13 |
| 1.1.4.2. Δράση κυτοκινών και ανοσορυθμιστικών παραγόντων | 15 |
| 1.2. Η Υπέρταση και τα Συστήματα Ρύθμισής της | 18 |
| 1.2.1. Η Αρτηριακή πίεση- Υπέρταση | 18 |
| 1.2.2. Συστήματα ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης | 19 |
| 1.2.2.1. Το σύστημα ρενίνης- αγγειοτενσίνης και το ένζυμο ACE..... | 19 |
| 1.3. Λειτουργικά Τρόφιμα και Βιοενεργά Συστατικά..... | 21 |
| 1.3.1.Βιοενεργά Πεπτίδια και Προαγωγή της Υγείας | 22 |
| 1.3.1.1. Πεπτίδια με ανοσορυθμιστική δράση | 24 |
| 1.3.1.2. Πεπτίδια με αντιυπερτασική δράση | 25 |
| 1.4. Μικροφύκη (Μικροάλγη) | 26 |
| 1.4.1. Σπιρουλίνα (Arthrospira-Spirulina) | 28 |
| 1.4.1.1. Καλλιέργεια και Παραγωγή Σπιρουλίνας..... | 31 |
| 1.4.1.2. Συλλογή και επεξεργασία σπιρουλίνας | 35 |
| 1.4.1.3. Χημική Σύσταση Σπιρουλίνας | 36 |
| 1.4.1.4. Η Σπιρουλίνα ως Λειτουργικό Τρόφιμο..... | 41 |
| 1.4.1.5. Τα Βιοενεργά Πεπτίδια της Σπιρουλίνας..... | 43 |
| 1.4.2. Χλωρέλλα (<i>Chlorella</i>) | 45 |
| 1.4.2.1. Καλλιέργεια και Παραγωγή Χλωρέλλας | 47 |
| 1.4.2.2. Συλλογή και επεξεργασία χλωρέλλας..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.2.3. Χημική Σύσταση Χλωρέλλας..... | 49 |
| 1.4.2.4. Η Χλωρέλλα ως Λειτουργικό Τρόφιμο | 53 |
| 1.4.2.5. Τα Βιοενεργά Πεπτίδια της Χλωρέλλας..... | 54 |
| 1.5. Γιαούρτι..... | 55 |
| 1.5.1. Παραγωγή Γιαουρτιού | 57 |
| 1.5.1.1. Πρώτες ύλες..... | 57 |
| 1.5.1.2. Βασικά στάδια παρασκευής | 58 |
| 1.5.2. Κατηγορίες γιαουρτιού | 61 |
| 1.5.2.1. Παραδοσιακό γιαούρτι..... | 61 |
| 1.5.2.2. Βιομηχανικό γιαούρτι | 63 |
| 1.5.2.3. Στραγγιστό γιαούρτι..... | 64 |
| 1.5.2.4. Άλλα είδη γιαουρτιού | 64 |
| 1.5.3. Χημική Σύσταση, Θρεπτική Αξία και Μεταβολές κατά τη Παρασκευή του Γιαουρτιού..... | 65 |
| 1.5.4. Ευεργετικές ιδιότητες του γιαουρτιού στην υγεία | 67 |
| 1.5.5. Καινοτόμο προϊόν γιαουρτιού εμπλουτισμένο με μικροφύκη | 71 |
| Κεφάλαιο 2^ο..... | 75 |
| Σκοπός της Μελέτης | 75 |
| 2.1. Εισαγωγή στην Πειραματική Διαδικασία..... | 75 |
| Κεφάλαιο 3^ο..... | 77 |
| Υλικά και Μέθοδοι..... | 77 |
| 3.1. Συλλογή και Προετοιμασία Δειγμάτων | 77 |
| 3.1.1. Δείγματα και Δειγματοληψία | 77 |
| 3.1.1.1. Δείγματα μικροφυκών..... | 77 |
| 3.1.1.2. Δείγματα επιδορπίων γιαουρτιού | 78 |
| 3.1.2. <i>In vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των δειγμάτων..... | 80 |
| 3.1.2.1. Σκοπός..... | 80 |
| 3.1.2.2. Προετοιμασία πειράματος | 81 |
| 3.1.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων αλάτων και διαλυμάτων SSF, SGF και SIF..... | 81 |
| 3.1.2.4. Διαδικασία προσομοίωσης των τριών φάσεων της πέψης (στοματική, γαστρική, εντερική). | 83 |
| 3.1.2.5. Χειρισμός των δειγμάτων μετά την πέψη..... | 87 |
| 3.1.3. Απομόνωση κλάσματος πεπτιδίων από προϊόντα πέψης..... | 87 |
| 3.2. Προσδιορισμός διαλυτότητας δισθενούς σιδήρου (Fe ²⁺) στα μικροφύκη ύστερα από <i>in vitro</i> πέψη (ferrozine assay)..... | 88 |

| | |
|---|------------|
| 3.3. Μελέτη Ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων..... | 91 |
| 3.3.1. Χειρισμοί κυτταρικής σειράς | 91 |
| 3.3.1.1. Κυτταρική σειρά..... | 91 |
| 3.3.1.2. Καλλιέργεια κυττάρων..... | 92 |
| 3.3.1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (passaging-subculturing)..... | 93 |
| 3.3.1.4. Μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer..... | 94 |
| 3.3.1.5. Διαφοροποίηση των μονοκύτταρων THP-1 σε μακροφάγα..... | 95 |
| 3.3.1.6. Διέγερση των κυττάρων με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) | 97 |
| 3.3.2. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT | 98 |
| 3.3.3. Έκθεση των κυττάρων στα πεπτίδια των δειγμάτων | 101 |
| 3.3.4. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας | 102 |
| 3.3.4.1. Απομόνωση ολικού RNA κυττάρων με NucleoZOL | 102 |
| 3.3.4.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων..... | 104 |
| 3.3.4.3. Καθαρισμός ολικού RNA με DNase I..... | 105 |
| 3.3.4.4. Κατακρήμνιση RNA | 106 |
| 3.3.4.5. Αντίστροφη μεταγραφή (<i>Reverse Transcription, RT</i>) | 106 |
| 3.3.4.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (<i>quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR</i>) | 108 |
| 3.4. Μελέτη Αντιυπερτασικών ιδιοτήτων..... | 117 |
| 3.4.1. Προσδιορισμός ανασταλτικής δράσης κατά του ενζύμου ACE σε υπόστρωμα FAPGG..... | 117 |
| 3.5. Επεξεργασία Δεδομένων και Στατιστική Ανάλυση..... | 119 |
| Κεφάλαιο 4ο | 120 |
| Αποτελέσματα | 120 |
| 4.1. Αποτελέσματα διαλυτότητας δισθενούς σιδήρου (Fe ²⁺) μικροφυκών..... | 120 |
| 4.1.1. Αποτελέσματα για <i>Spirulina platensis</i> | 120 |
| 4.1.2. Αποτελέσματα για <i>Chlorella vulgaris</i> | 121 |
| 4.2. Αποτελέσματα δοκιμής MTT | 122 |
| 4.2.1. Αποτελέσματα βιωσιμότητας κυττάρων ύστερα από έκθεση σε πεπτιδικά κλάσματα μικροφυκών | 122 |
| 4.2.2. Αποτελέσματα βιωσιμότητας κυττάρων ύστερα από έκθεση σε πεπτιδικά κλάσματα γιαουρτιού, επιδορπίων γιαουρτιού, βιομάζας και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της <i>Spirulina platensis</i> | 123 |
| 4.3. Αποτελέσματα Real Time PCR..... | 125 |
| 4.3.1. Αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης κυττάρων ύστερα από έκθεση σε προϊόντα πέψης μικροφυκών | 126 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2. Αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης κυττάρων ύστερα από έκθεση σε προϊόντα πέψης γιαουρτιού, επιδορπίων γιαουρτιού, βιομάζας και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της <i>Spirulina platensis</i> | 130 |
| 4.4. Αποτελέσματα μεθόδου μέτρησης ACE-αναστολής (%)..... | 134 |
| Κεφάλαιο 5° | 136 |
| Συζήτηση | 136 |
| 5.1. Ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες μικροφυκών | 136 |
| 5.2. Ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα/συστατικά της <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> | 141 |
| 5.3. Αντιυπερτασικές ιδιότητες επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα/συστατικά της <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> | 145 |
| 5.4. Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου μικροφυκών | 150 |
| Κεφάλαιο 6° | 152 |
| Συμπεράσματα | 152 |
| Βιβλιογραφία..... | 154 |
| Ελληνική βιβλιογραφία..... | 154 |
| Ξένη βιβλιογραφία | 155 |
| Ιστότοποι..... | 176 |

Κατάλογος Πινάκων

| | |
|--|-----|
| Πίνακας 1.1: Στοιχεία ταξινόμησης των μικροφυκών <i>Spirulina Platensis</i> και <i>Chlorella vulgaris</i> | 28 |
| Πίνακας 1.2: Θρεπτικά συστατικά σκόνης σπιρουλίνας (ανά 100 g)..... | 37 |
| Πίνακας 1.3: Περιεκτικότητα σκόνης σπιρουλίνας σε βιταμίνες (ανά 100 g)..... | 41 |
| Πίνακας 1.4: Βιοενεργά πεπτίδια σπιρουλίνας και οι βιολειτουργικές τους ιδιότητες (<i>in vitro</i>)..... | 44 |
| Πίνακας 1.5: Σύσταση χλωρέλλας (<i>Chlorella vulgaris</i>) (Προσαρμοσμένο από Safi <i>et al.</i> , 2014)..... | 50 |
| Πίνακας 1.6: Βιοενεργά πεπτίδια χλωρέλλας και οι βιολειτουργικές τους ιδιότητες..... | 55 |
| Πίνακας 1.7: Σύσταση διαφόρων ειδών γιαουρτιού ανά 100 g προϊόντος..... | 67 |
| Πίνακας 3.1: Πληροφορίες των υπό μελέτη δειγμάτων μικροφυκών..... | 78 |
| Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη δειγμάτων επιδορπίων γιαουρτιού..... | 80 |
| Πίνακας 3.3: Ποσότητες αλάτων για την παρασκευή των διαλυμάτων SSF, SGF και SIF..... | 83 |
| Πίνακας 3.4: Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά φάση της γαστρεντερικής πέψης για 5 g δείγματος..... | 85 |
| Πίνακας 3.5: Ποσότητες ενζύμων και χολικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα..... | 85 |
| Πίνακας 3.6: Όγκοι αντιδραστηρίων ανά δείγμα για την παρασκευή 10 μ L του αντιδρώντος μίγματος (master mix) της αντίστροφης μεταγραφής..... | 107 |
| Πίνακας 3.7: Αλληλουχίες, Αποδοτικότητα και Συγκέντρωση εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 112 |
| Πίνακας 3.8 : Ποσότητες ανά αντίδραση για την παρασκευή του master mix..... | 115 |
| Πίνακας 3.9: Στάδια και συνθήκες θέρμανσης κατά την qPCR..... | 116 |

Κατάλογος Διαγραμμάτων

| | |
|--|-----|
| Διάγραμμα 4.1: Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) (%) στα δείγματα της <i>Spirulina platensis</i> | 120 |
| Διάγραμμα 4.2: Συγκέντρωση (μM) δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στα δείγματα της <i>Spirulina platensis</i> | 121 |
| Διάγραμμα 4.3: Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) (%) στα δείγματα της <i>Chlorella vulgaris</i> | 121 |
| Διάγραμμα 4.4: Συγκέντρωση (μM) δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στα δείγματα της <i>Chlorella vulgaris</i> | 122 |
| Διάγραμμα 4.5: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα των δειγμάτων μικροφυκών και αρνητικού μάρτυρα της πέψης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90), 20% (20_80) και 50% (50_50)..... | 123 |
| Διάγραμμα 4.6: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB), πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE) καθώς και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90), 20% (20_80) και 25% (25_75)..... | 124 |
| Διάγραμμα 4.7: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της <i>Spirulina platensis</i> (Y.L.) και με διαφορετικούς χρόνους διατήρησης (t_0 , t_1 , t_2), σκέτου γιαουρτιού (YC) καθώς και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90) και 20% (20_80)..... | 125 |
| Διάγραμμα 4.8: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-6, ICAM-1, TNF- α , TNF-rec και LST1 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της <i>Spirulina platensis</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και <i>Chlorella vulgaris</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe)..... | 127 |
| Διάγραμμα 4.9: Σχετική έκφραση των γονιδίων MMP9, MyD88, MCP-1, TGF- β , του ενζύμου COX-2, και των μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B, TLR2 και TLR4 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της <i>Spirulina platensis</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και <i>Chlorella vulgaris</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe)..... | 128 |
| Διάγραμμα 4.10: Σχετική έκφραση των γονιδίων NF- κ B-Rela, IRF5, STAT1 και STAT2, από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της <i>Spirulina platensis</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και <i>Chlorella vulgaris</i> (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe)..... | 129 |
| Διάγραμμα 4.11: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1 β , IL-10, IL-8 και IL-6 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB) καθώς και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE)..... | 131 |

Διάγραμμα 4.12: Σχετική έκφραση των γονιδίων NF-κB-Rela, TNF-α, TGF-β, TLR4 και TLR2 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/ πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB) καθώς και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE).....132

Διάγραμμα 4.13: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1β, IL-8 και TNF-α από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC) και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL).....133

Διάγραμμα 4.14: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-10, IL-6, TGF-β, NF-κB-Rela, TLR2 και TLR4 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC) και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL).....133

Διάγραμμα 4.15: Ποσοστό ACE-ανασταλτικής δράσης πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB), πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE) και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (blank).....135

Διάγραμμα 4.16: Ποσοστό ACE-ανασταλτικής δράσης πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *S. platensis* (YL) και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (blank).....135

Κατάλογος Εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1.1: Μονοπάτια παραγωγής κυτοκινών και ανοσορυθμιστικών παραγόντων από THP-1 κύτταρα ύστερα από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS)..... | 15 |
| Εικόνα 1.2: Η σπιρουλίνα όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο..... | 29 |
| Εικόνα 1.3: Εγκαταστάσεις εντατικής παραγωγής σπιρουλίνας στην Καλιφόρνια (αριστερά) και στη Χαβάη (δεξιά)..... | 32 |
| Εικόνα 1.4: Ανοιχτού τύπου καλλιέργειες για παραγωγή μικροφυκών σε μορφή επιμήκους (αριστερά) και κυκλικής λεκάνης (δεξιά)..... | 33 |
| Εικόνα 1.5: Διάφοροι τύποι κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) Φωτοβιοαντιδραστήρες κεκλιμένης στήλης, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) Πλαστικοί σάκοι πολυαιθυλενίου και (4) σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες..... | 35 |
| Εικόνα 1.6: Διαχωρισμός της κυανής χρωστικής φυκοκυανίνης από ίζημα σπιρουλίνας σε νερό..... | 39 |
| Εικόνα 1.7: Χλωρέλλα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο..... | 47 |
| Εικόνα 1.8: Σχηματισμός επιδερμίδας (πέτσας) στην επιφάνεια γάλακτος κατά την παρασκευή παραδοσιακού γιαουρτιού..... | 62 |
| Εικόνα 1.9: Σύριγγες εμβολιασμού οξυγαλακτικής καλλιέργειας..... | 62 |
| Εικόνα 3.1: Δείγματα μικροφυκών σε λυοφιλωμένη μορφή: <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> (αριστερά) και <i>Chlorella vulgaris</i> (δεξιά)..... | 77 |
| Εικόνα 3.2: Δείγματα (επιδορπίων) γιαουρτιού: (Α.) Σκέτο γιαούρτι από πρόβειο γάλα, (Β.) Επιδόρπιο γιαουρτιού εμπλουτισμένο με εκχύλισμα πρωτεϊνών της <i>Spirulina platensis</i> και (Γ.) Επιδόρπιο γιαουρτιού με προσθήκη βιομάζας της <i>Spirulina platensis</i> | 78 |
| Εικόνα 3.3: Βιομάζα της <i>Spirulina platensis</i> σε λυοφιλωμένη μορφή..... | 79 |
| Εικόνα 3.4: Δείγματα κατά τη διάρκεια επώασης και κυκλικής ανάδευσης στην εντερική φάση της <i>in vitro</i> πέψης..... | 87 |
| Εικόνα 3.5: Φυγοκεντρικός σωλήνας με προσαρμοσμένη μεμβράνη φίλτρου..... | 88 |
| Εικόνα 3.6: Κλάσματα πεπτιδίων με μέγεθος < 3 kDa εντός φιαλιδίων τύπου falcon (15 mL)..... | 88 |
| Εικόνα 3.7: Δείγματα μικροφυκών πριν την πέψη που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού σιδήρου με τη μέθοδο της φερροζίνης..... | 91 |
| Εικόνα 3.8: Πλάκα Neubauer και πλέγματα μέτρησης κυττάρων..... | 95 |
| Εικόνα 3.9: Μονοκύτταρα (αριστερά) και Μακροφάγα (δεξιά) THP-1 όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγεθυντικό φακό 20x..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| Εικόνα 3.10: Δομή βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS)..... | 98 |
| Εικόνα 3.11: Αναγωγή κίτρινου άλατος τετραζολίου σε ιώδες κρύσταλλο φορμαζάνης παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση..... | 99 |
| Εικόνα 3.12: Σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης από μακροφάγα THP-1 κατά τον προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε συγκεντρώσεις $0,8 \times 10^5$ κύτταρα/οπή, και σε μεγεθυντικό φακό 20x. Με βέλος υποδεικνύεται ένας κρύσταλλος φορμαζάνης..... | 100 |
| Εικόνα 3.13: Πλάκα 96-φρεατίων με διαλυτοποιημένους σε DMSO κρυστάλλους φορμαζάνης. Όσο πιο έντονο το ιώδες χρώμα στο κελί της πλάκας, τόσο περισσότεροι οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίστηκαν, άρα τόσο περισσότερα βιώσιμα κύτταρα και μικρότερη η κυτταροτοξικότητα από την έκθεση στην εκάστοτε συγκέντρωση του δείγματος..... | 101 |
| Εικόνα 3.14: Παράδειγμα εισαγωγής δειγμάτων σπιρουλίνας (S.61 και S.183) σε πλάκα 12-φρεατίων κατά την έκθεση των κυττάρων στο κλάσμα πεπτιδίων της <i>Spirulina platensis</i> . Τα γράμματα Α και Β αντιστοιχούν στις δύο επαναλήψεις <i>in vitro</i> πέψης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα..... | 102 |
| Εικόνα 3.15: Διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA κυττάρων με NucleoZOL..... | 104 |
| Εικόνα 3.16: Μηχανισμός δράσης της χρωστικής IC Green 2..... | 109 |
| Εικόνα 3.17: Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης qPCR. Κάθε καμπύλη με διαφορετικό χρώμα αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό δείγμα..... | 110 |
| Εικόνα 3.18: Καμπύλη αποδιάταξης..... | 114 |
| Εικόνα 3.19: Καμπύλη $-\Delta F/\Delta T$ προς T (°C)..... | 114 |
| Εικόνα 3.20: Τρόπος τοποθέτησης δειγμάτων μικροφυκών σε πλάκα 96-φρεατίων PCR. Μπλε: LPS/Negative control/ Blank, Πράσινο: δείγματα σπιρουλίνας (Α και Β), Πορτοκαλί: δείγματα χλωρέλλας (Α και Β)..... | 116 |
| Εικόνα 3.21: Υδρόλυση του υποστρώματος FAPGG από το ένζυμο ACE..... | 118 |

Κατάλογος Σχημάτων

| | |
|---|----|
| Σχήμα 1.1: Σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης..... | 21 |
| Σχήμα 1.2: Τα βασικότερα βιολειτουργικά συστατικά της σπιρουλίνας και οι επιδράσεις τους στην υγεία..... | 43 |
| Σχήμα 1.3: Διάγραμμα ροής παραγωγής συνεκτικού..... | 63 |

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

1.1. Το Ανοσοποιητικό Σύστημα

1.1.1. Έμφυτη και ειδική ανοσία

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι από τα πιο πολύπλοκα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έγκειται στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στους παθογόνους παράγοντες (π.χ. βακτήρια, μύκητες, ιοί) και επιτυγχάνεται μέσω δύο βασικών τύπων ανοσίας, της έμφυτης ή μη ειδικής (innate immunity) αρχικά, και στη συνέχεια μέσω της προσαρμοστικής ή ειδικής ανοσίας (specific immunity) (Bouman *et al.*, 2004; Chanput, 2012; Abbas & Lichtman, 2011; Chun *et al.*, 2016). Η έμφυτη ανοσία, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στο αντιγόνο, και χαρακτηριστικό της είναι η μη ειδικότητα ως προς τα αντιγόνα τα οποία αναγνωρίζει. Η ειδική ανοσία από την άλλη, εμφανίζεται μετά την εισβολή του αντιγόνου στον οργανισμό και μπορεί να διαρκέσει από ημέρες έως και εβδομάδες. Βασικό χαρακτηριστικό της ειδικής ανοσίας είναι η ικανότητα της πλήρους διάκρισης και εξειδίκευσης ως προς την αντιμετώπιση του κάθε αντιγόνου. Παράλληλα ο τύπος αυτός της ανοσίας χαρακτηρίζεται και από την ικανότητα της μνήμης, καθώς τα κύτταρα που συμμετέχουν στην ειδική ανοσία μπορούν να «θυμούνται» και να ανταποκρίνονται έντονα και ταχύτερα σε επαναλαμβανόμενες μολύνσεις από το ίδιο αντιγόνο (Abbas & Lichtman, 2011). Τα κυρίαρχα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι τα φαγοκυτταρικά κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer, NK) τα μονοκύτταρα και μακροφάγα, ενώ της ειδικής ανοσίας τα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα (Bouman *et al.*, 2004). Όλα τα κύτταρα που συμμετέχουν στις ανοσοαποκρίσεις (Τ και Β λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, APCs, κ.α.) προέρχονται από τη διαφοροποίηση πολυδύναμων πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells) (Abbas & Lichtman, 2011). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά είναι οργανωμένα σε διάφορους ιστούς και όργανα του σώματος που αναφέρονται ως λεμφικό σύστημα. Το λεμφικό σύστημα των θηλαστικών αποτελείται από τους πρωτογενείς (θύμος αδένας και μυελός των οστών) και δευτερογενείς (π.χ. σπλήνας, λεμφαδένες, αμυγδαλές) λεμφικούς ιστούς και όργανα.

1.1.2. Μονοκύτταρα- Μακροφάγα

Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα μακροφάγα προερχόμενα από διαφοροποιημένα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα αποτελούν πρόδρομα κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος, που παράγονται στο μυελό των οστών και έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιούνται τοπικά σε μακροφάγα κατά την μεταφορά τους από την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς σε συνθήκες φλεγμονής (Kanekanian, 2014). Τα μακροφάγα με τη σειρά τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία ως κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου, και επιτελούν τις εξής τρεις κύριες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος: 1) φαγοκύτωση, 2) αναγνώριση και παρουσίαση αντιγόνου μέσω ειδικών υποδοχέων στα T-λεμφοκύτταρα και 3) παραγωγή προ- και αντί- φλεγμονωδών κυτοκινών (Daigneault *et al.* 2010, He *et al.*, 2012; Chanput *et al.*, 2014; Chun *et al.*, 2016) με αποτέλεσμα να συμμετέχουν στην επούλωση πληγών και την αντιμετώπιση της φλεγμονής (Chanput, 2012). Επιπλέον, τα μακροφάγα χαρακτηρίζονται ως δυναμικά και ετερογενή κύτταρα καθώς μπορούν *in vivo* να ταξινομηθούν σε δύο καταστάσεις ενεργοποίησης, ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον τους. Στην πρώτη κατάσταση ανήκουν τα κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή μακροφάγα M1 τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα κατά της βακτηριακής και ιογενούς λοίμωξης και χαρακτηρίζονται από την αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNFα) και οι ιντερλευκίνες IL-1b, IL6, IL8, IL12 (Chanput *et al.*, 2013; Millan-Linares *et al.*, 2014). Ο φαινότυπος M1 προκύπτει ύστερα από την έκθεση των μακροφάγων σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και σε IFN-γ (Okabe & Medzhitov, 201). Στην δεύτερη κατάσταση ανήκουν τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή μακροφάγα M2 τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης, στις αλλεργίες και στην εξέλιξη των όγκων. Τα M2 μακροφάγα προκύπτουν από την έκθεση των κυττάρων σε προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-4 (Chanput *et al.*, 2013). Έχουν εκτιμηθεί και άλλα μονοπάτια ενεργοποίησης των μακροφάγων που απαιτούν εκτενέστερη μελέτη (Okabe & Medzhitov, 2014). Στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της ανοσιακής απόκρισης χρησιμοποιήθηκαν τα M1 μακροφάγα.

1.1.3. Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες (cytokines) είναι μικρού μοριακού βάρους διαλυτές πρωτεΐνες που παράγονται από ποικιλία κυττάρων ανάμεσα στα οποία και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι κύριες κατηγορίες των κυττάρων που παράγουν τις κυτοκίνες είναι τα μονοκύτταρα-μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα. Η βασική λειτουργία των κυτοκινών είναι ο συντονισμός της λειτουργίας πολλών διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσιακή απόκριση. Ο τρόπος δράσης των κυτοκινών διακρίνεται σε αυτοκρινή (όταν προσδένονται σε υποδοχείς του ίδιου κυττάρου που τις εκκρίνει), παρακρινή (όταν προσδένονται σε υποδοχείς κυττάρων-στόχων που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο το οποίο τις εκκρίνει), και ενδοκρινή (όταν προσδένονται σε υποδοχείς κυττάρων που βρίσκονται μακριά από το κύτταρο το οποίο τις εκκρίνει). Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα καλούνται συχνά και λεμφοκίνες ενώ αυτές που εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα καλούνται μονοκίνες.

Ανάλογα με τη δομή τους οι κυτοκίνες διακρίνονται σε: 1) ιντερλευκίνες (interleukins, ILs), 2) ιντερφερόνες (interferones, IFNs) 3) παράγοντες νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNFα) 4) διεγερτικοί παράγοντες αποικιών (Colony Stimulating Factors, CSFs) και 5) χημειοκίνες.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των κυτοκινών είναι 1) ο πλειοτροπισμός, η ικανότητα δηλαδή μιας κυτοκίνης να ασκεί διαφορετικές βιολογικές δράσεις σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς, 2) ο πλεονασμός, όταν διαφορετικές κυτοκίνες πραγματοποιούν την ίδια δράση 3) η συνεργιστική δράση, όταν δύο κυτοκίνες επιτελούν την ίδια λειτουργία στο κύτταρο στόχο και 4) ανταγωνιστική δράση, όταν μία κυτοκίνη εμποδίζει τη δράση μιας άλλης κυτοκίνης. Επίσης, ένα κύτταρο μπορεί να παράγει πολλές κυτοκίνες, ενώ μία κυτοκίνη μπορεί να διεγείρει την παραγωγή άλλων κυτοκινών από άλλα κύτταρα (Dinarello, 2007; Abbas & Lichtman, 2011). Η έκφραση των κυτοκινών από καλλιέργειες κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθορισμό της ανοσιακής απόκρισης (Chanput *et al.* 2010).

1.1.4. Μονοπάτια παραγωγής και δράση κυτοκινών και ανοσορυθμιστικών παραγόντων

1.1.4.1. Μονοπάτια παραγωγής κυτοκινών

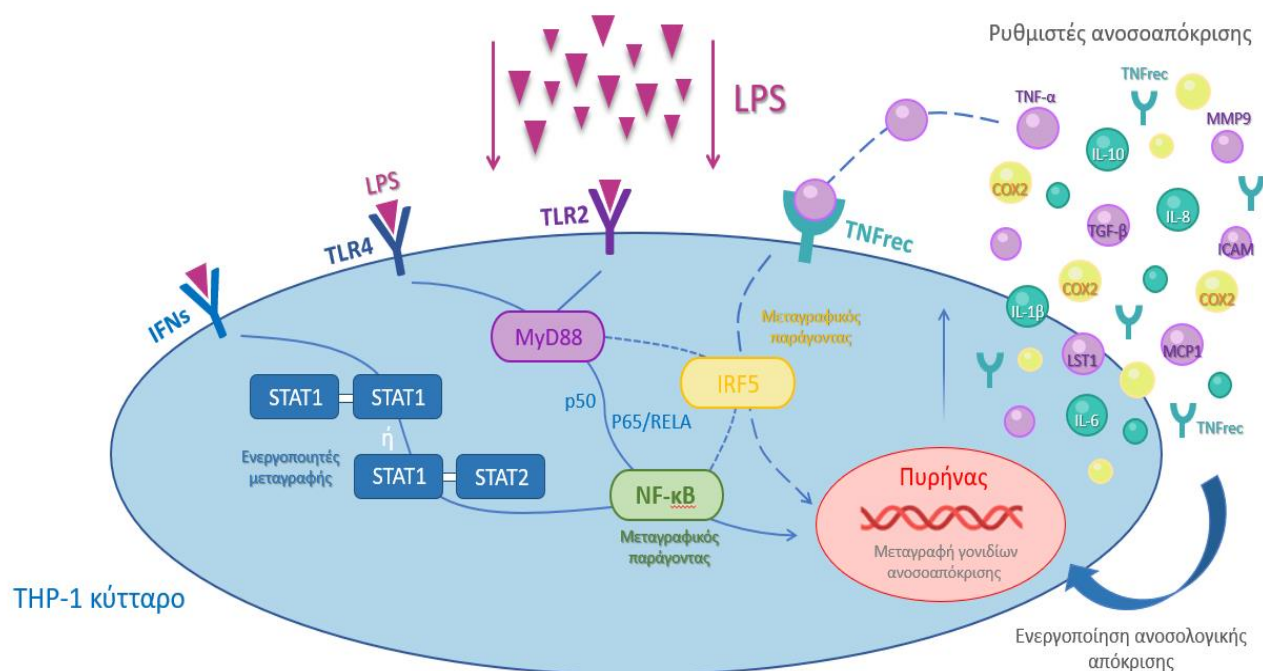
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συγκεκριμένα μονοπάτια παραγωγής ιντερλευκινών (IL-) και παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNF-) τα οποία ενεργοποιούνται από τα σύμπλοκα Toll Like Receptor-2 και -4 (TLR-2 και TLR-4) όπως απεικονίζεται παρακάτω (**Εικόνα 1.1**). Η ενεργοποίηση των TLR-2 και TLR-4, δύο υποδοχέων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, συνδέεται με την παθοφυσιολογία πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Οι TLRs είναι

υποδοχείς που αναγνωρίζουν εξωγενή και ενδογενή μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβες και παθογόνα (ιοί, μύκητες, βακτήρια), συμπεριλαμβανομένου και του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) από το κυτταρικό τοίχωμα gram (-) αρνητικών βακτηρίων, συμβάλλοντας στην έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης και ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας (Kim & Karin, 2011; Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012; Lucas & Maes, 2013). Έχουν εντοπισθεί στη μεμβράνη ενδοθηλιακών, επιθηλιακών και ανοσοποιητικών κυττάρων και η ενεργοποίηση όλων των υποδοχέων της οικογένειας TLR (με εξαίρεση του TLR-3) διεγείρει μια οδό σηματοδότησης εξαρτώμενη από τη προσαρμοστική πρωτεΐνη (adaptor protein) MyD88, που επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτό έχει ως συνέπεια την εσωτερική παραγωγή αρκετών ιντερλευκινών και άλλων ουσιών σηματοδότησης. Τα σήματα αυτά προσελκύουν τα μακροφάγα (Janssens, & Beyaert, 2002; O'Neill, 2003; Chanput, 2010; Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012; Lucas & Maes, 2013). Πιο ειδικά, ο NF-κB αποτελεί βασικό ρυθμιστή της έκφρασης ανοσορυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α), συμπεριλαμβανομένου της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), από μακροφάγα διεγερμένα με LPS. Η COX-2 αποτελεί ένζυμο που εκφράζεται παρουσία πολλών προ-φλεγμονωδών διαμεσολαβητών όπως IL-6, IL-1β, TNF-α και αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή στις φλεγμονώδεις διεργασίες (Chanput, 2010; He *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2015). Γενικότερα, ο NF-κB συνιστά απαραίτητο μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και διαθέτει αρκετές υπομονάδες (π.χ. p50, p52, p65/RELA, p100, p105). Μία από αυτές τις υπομονάδες, ο NF-κB-RELA/p65, έχει βρεθεί πως ενεργοποιείται κυρίως από τον υποδοχέα TLR-2 και ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ενώ ταυτόχρονα η ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί θετικά με πολλούς τύπους καρκίνου (Chang, *et al.*, 2013).

Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας που έχει μελετηθεί εκτενώς για τον κρίσιμο ρόλο του στη ρύθμιση του γονιδιακού δικτύου στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης-5 ή IRF-5 (Interferon Regulatory Factor-5). Ο IRF-5 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα Β-λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα και φαίνεται πως ενεργοποιείται από το μονοπάτι TLR-MyD88. Στους ρόλους του περιλαμβάνεται η διέγερση και ο πολλαπλασιασμός των Β-λεμφοκυττάρων, ενώ στα μακροφάγα επάγει την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (κυρίως στον φαινότυπο M1) ενώ καταστέλλει την έκφραση της αντι-φλεγμονώδους IL-10 και του TGF-β (Kaur *et al.*, 2018).

Ένα επιπλέον μονοπάτι έκφρασης γονιδίων ενεργοποιείται από τις ιντερφερόνες (IFNs) μέσω διαμεσολάβησης μιας οικογένειας πρωτεϊνών που δρουν ως μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Τέτοιες είναι οι STAT1 και STAT2 που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του

ανοσοποιητικού σε εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένου και των καταστάσεων φλεγμονής. Συμβάλουν στην έκφραση διαφόρων κυτοκινών (π.χ. IL-12 από STAT1) καθώς και γονιδίων που προκαλούν διακοπή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων και απόπτωση. Διαθέτουν την ικανότητα να δρουν σχηματίζοντας ομοδιμερή (π.χ. STAT1-STAT1) ή ετεροδιμερή (π.χ. STAT1- STAT2) ενώ η φωσφορυλίωσή τους αποτελεί μηχανισμό που ρυθμίζει τη δράση τους (Park *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2020).



Εικόνα 1.1: Μονοπάτια παραγωγής κυτοκινών και ανοσορρυθμιστικών παραγόντων από THP-1 κύτταρα ύστερα από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

1.1.4.2. Δράση κυτοκινών και ανοσορρυθμιστικών παραγόντων

I. MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9)

Η μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας-9 ή MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) είναι μια εξωκυττάρια ενδοπεπτιδάση που εμπλέκεται στη ρύθμιση των φαινομένων μεταγραφής και μετάφρασης, στην αναδιαμόρφωση της μήτρας υπό φυσιολογικές συνθήκες εμβρυογένεσης, στη γενικότερη αναδιαμόρφωση και διατήρηση ιστών, καθώς και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα της MMP-9 στον ορό και στα ούρα έχουν συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η MMP-9 συμβάλει στην προετοιμασία του προμεταστατικού ιστού για αποίκιση από κακοήθη κύτταρα επάγοντας τη μετάσταση μέσω ενεργοποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων. Η δράση της εξαρτάται από την παρουσία ψευδαργύρου και συνήθως το ένζυμο αυτό εκφράζεται σε ανενεργή πρόδρομη μορφή

(pro- MMP-9), συνδεδεμένη με ένα προπεπτίδιο, η αποδέσμευση του οποίου ενεργοποιεί την MMP-9. Εκφράζεται από μακροφάγα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που προσελκύονται από κυτοκίνες και σήματα που εκπέμπουν τα καρκινικά κύτταρα (Dziembowska & Wlodarczyk, 2012; Yousef *et al.*, 2014).

II. MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

Σε μια υποκατηγορία χημειοκινών ανήκει η πρωτεΐνη MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), που μαζί με άλλες χημειοκίνες εκφράζεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής σε διάφορα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού, αφού ακολουθήσει ενεργοποίησή τους από προφλεγμονώδης μεσολαβητές όπως TNF- α , IL-1 β , IL-4. Η MCP-1 ασκεί τη δράση της ύστερα από πρόσδεση σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας λευκοκυττάρων (π.χ. CCR2) ενεργοποιώντας το μονοπάτι του NF- κ B και προκαλεί ενεργοποίηση και μετανάστευση μονοκυττάρων από το μυελό των οστών στη κυκλοφορία του αίματος και κατ' επέκταση στο σημείο της φλεγμονής για έλεγχο των παραγόντων που την προκαλούν (Yadav & Arora, 2010).

III. LST-1 (Leukocyte Specific Transcript-1)

Η LST-1 (Leukocyte Specific Transcript-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη προσαρμογής (adaptor protein) που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα) και συμβάλει στη ρύθμιση της φλεγμονής, της μεταγραφής και της μετάφρασης. Η έκφρασή της έχει εντοπισθεί και στις κυτταρικές σειρές U-937 και THP-1 ύστερα από ενεργοποίηση με LPS ή TNF- α (Fabisik *et al.*, 2021).

IV. Ιντερλευκίνες (IL-)

Οι ιντερλευκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Μπορούν να διακριθούν σε προ-φλεγμονώδεις και αντί-φλεγμονώδεις ανάλογα με το αν επάγουν τη φλεγμονή ή αν την καταπολεμούν ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα και την απόκριση αντισωμάτων, αντίστοιχα. Γενικότερα, όπως προαναφέρθηκε οι περισσότερες ιντερλευκίνες παρουσιάζουν πλειοτροπική δράση, λειτουργώντας άλλοτε ως προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες και άλλοτε ως αντί-φλεγμονώδης. Ωστόσο, η έκφραση συγκεκριμένων κυτοκινών μπορεί να είναι καθοριστική στην έκβαση της φλεγμονής.

Οι αντί-φλεγμονώδεις κυτοκίνες είναι μία σειρά ανοσορυθμιστικών μορίων που ελέγχουν τη προ-φλεγμονώδη απόκριση των κυτοκινών (Opal & DePalò, 2000). Η IL-10 είναι μια κυτοκίνη με ισχυρή αντί-φλεγμονώδη δράση που παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη φλεγμονωδών και αυτοάνοσων καταστάσεων. Τα μακροφάγα αποτελούν μια από τις κύριες πηγές της (Iyer & Cheng, 2012).

Η IL-6 είναι μία κυτοκίνη που δεν εμπλέκεται μόνο στις αντιδράσεις της φλεγμονής και της μόλυνσης αλλά και στην ρύθμιση των μεταβολικών, αναγεννητικών και νευρικών διεργασιών. Εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων όπως τα T και B κύτταρα, τα μονοκύτταρα, και μακροφάγα και άλλοτε δρα ανασταλτικά στην φλεγμονή κυρίως μέσω της αναστολής έκκρισης του TNF- α ενώ άλλοτε εκδηλώνει προ-φλεγμονώδη δράση (Srirangan & Choy, 2010).

Άλλη μια ιντερλευκίνη γνωστή κυρίως για τη προ-φλεγμονώδη δράση της είναι η IL-8. Η απελευθέρωση της κυτοκίνης αυτής ενεργοποιείται από ειδικά φλεγμονώδη σήματα που παράγουν τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα ή μακροφάγα. Έχει αναγνωριστεί ως χημειοτακτικός παράγοντας που προάγει τη μετανάστευση και τη δράση ουδετερόφιλων, βασεόφιλων και T-λεμφοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Ωστόσο, η παρατεταμένη παρουσία της στην κυκλοφορία του αίματος ως απόκριση σε φλεγμονώδεις καταστάσεις μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό στους ιστούς. Οι λιποπολυσακχαρίτες, η IL-1 β και ο TNF- α είναι ικανοί να αυξήσουν την έκκριση της IL-8, σε αντίθεση με την IL-10 που αποτελεί ισχυρό αναστολέα της σύνθεσης IL-8 και δρα ανταγωνιστικά ως προς αυτήν (Ghasemi *et al.*, 2011).

Τέλος να αναφερθεί πως οι κυτοκίνες IL-12 και IL-1 β αποτελούν βασικές προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες. Η IL-1 β μάλιστα δρα συνεργιστικά με την TNF- α σχεδόν σε κάθε *in vivo* και *in vitro* μοντέλο, γεγονός που τις καθιστά στρατηγικής σημασίας για την έναρξη και εξέλιξη της φλεγμονής (Dinarello, 1997).

V. TGF- β (Transforming Growth Factor- β)

Ο παράγοντας TGF- β (Transforming Growth Factor- β) είναι μία πολυλειτουργική κυτοκίνη με ποικίλες δράσεις στον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την μετανάστευση, τη φλεγμονή, την επιδιόρθωση βλαβών στους ιστούς και τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Ο ρόλος του TGF- β φαίνεται να είναι προστατευτικός στην ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων καθώς αναστέλλει τις αποκρίσεις των ανοσοκυττάρων και προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ενεργοποιείται από τη παρουσία αντί-φλεγμονωδών κυτοκινών (Akihiko *et al.* 2010).

VI. TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)

Ο TNF- α είναι μία κυτοκίνη που δρα πλειοτροπικά σε έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, στην διατήρηση της ομοιόστασης και έχει αντικαρκινική δράση (μείωση όγκων και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος-απόπτωση). Επιπλέον, εκτός από το έναυσμα που δίνει για τη παραγωγή αντι-φλεγμονωδών (π.χ. IL-10 και TGF- β), προ-φλεγμονωδών (π.χ. IL-6 και IL-8) κυτοκινών καθώς και του ίδιου του TNF- α , συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των

ανοσοποιητικών κυττάρων. Εκκρίνεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μονοκύτταρα σε απόκριση πολλών φλεγμονοδών και ανοσολογικών ερεθισμάτων και η έκφρασή της ενεργοποιείται τόσο από τον παράγοντα NF-κΒ όσο και από τον IRF-5. Παράγοντες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση της έκφρασης του TNF-α είναι οι βακτηριακές (LPS), ιικές και παρασιτικές μολύνσεις, τα καρκινικά κύτταρα, το τραύμα και οι κυτοκίνες IL-1β, IL-2, IFN-γ (Wajant & Scheurich, 2001; Wajant *et al.*, 2003; Leister *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018). Η άσκηση της βιολογικής της δράσης επιτυγχάνεται ύστερα από πρόσδεση σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, TNF-receptor1 (TNFR1) και TNF-receptor2 (TNFR2). Ο υποδοχέας TNFR1 βρίσκεται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των κυττάρων, ενώ ο TNFR2 κυριαρχεί στα T-κύτταρα. Έχει βρεθεί πως η διαμεσολάβηση του TNFR1 οδηγεί κυρίως σε προ-φλεγμονώδη δράση, ενώ του TNFR2 στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και την αναγέννηση ιστών (Wajant & Scheurich, 2001; Yang *et al.*, 2018).

VII. ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule)

Η οδός σηματοδότησης του TNF-α που διαμεσολαβείτε από NF-κΒ είναι υπεύθυνη για την έκφραση διακυτταρικών μορίων πρόσδεσης (Intercellular Adhesion Molecule, ICAM) όπως το ICAM-1 (Bui *et al.*, 2020). Το ICAM-1 αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη της επιφάνειας των κυττάρων που λειτουργεί ως υποδοχέας πρόσδεσης μεταξύ αυτών, προκαλώντας τη μετακίνησή τους από την κυκλοφορία του αίματος στο σημείο φλεγμονής. Το γονίδιο του εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σε απόκριση της φλεγμονής, και εκτός από το TNF-α η έκφρασή του ενεργοποιείται και από την IL-1β και την IFN-γ. Έχει αποδειχθεί ότι προάγει τόσο τις προ- όσο και τις αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις διεγείροντας την παραγωγή κυτοκινών με αντίστοιχες δράσεις (Bui *et al.*, 2020).

1.2. Υπέρταση και τα Συστήματα Ρύθμισής της

1.2.1. Η Αρτηριακή πίεση- Υπέρταση

Η αρτηριακή πίεση (blood pressure, BP) είναι η υδροστατική πίεση των αγγειακών τοιχωμάτων που προκαλείται από τη ροή του αίματος. Υπάρχουν δύο μορφές αρτηριακής πίεσης: α) η συστολική πίεση, η οποία αντιστοιχεί στη στιγμή της εξώθησης της καρδιάς και β) η διαστολική η οποία αντιστοιχεί στη φάση της διαστολής της καρδιάς και είναι η στιγμή που γίνεται αιμάτωση των στεφανιαίων αγγείων. Η αύξηση της αρτηριακής πίεσης σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της συστολικής πίεσης >140 mmHg και της διαστολικής >90 mmHg χαρακτηρίζεται ως υπέρταση (Karlson, 2000). Προκαλείται από την αντίσταση των αρτηριών και τριχοειδών αγγείων στη ροή του αίματος και επηρεάζεται από τον όγκο των

υγρών στη κυκλοφορία και την ποσότητα των διαλυμένων σωματιδίων σε αυτό (Ζαμπέλας, 2017). Η υπέρταση αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων και νοσημάτων των νεφρών, καθώς και ένα από τα σημαντικότερα και πιο συχνά προβλήματα υγείας παγκοσμίως έχοντας προσβάλει περισσότερα από 1 δισεκατομμύριο άτομα (Porat, 2003). Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις ανεπτυγμένες χώρες και σε μεγάλες ηλικίες. Η υπέρταση θεωρείται ως μία ιδιαίτερα επικίνδυνη ασθένεια, καθώς συχνά δεν παρουσιάζει άμεσα συμπτώματα και κατά συνέπεια δεν πραγματοποιείται έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου (Hermansen, 2000). Βρίσκεται για αρκετά χρόνια σε λανθάνουσα κατάσταση επιβαρύνοντας διαρκώς τη λειτουργικότητα των αγγείων και γίνεται αντιληπτή κυρίως μέσω των σοβαρών αποτελεσμάτων της, όπως είναι το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ή το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τα οποία μπορεί να είναι και θανατηφόρα. Βασικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη ή μη της υπέρτασης είναι οι διατροφικές συνήθειες και ο τρόπος ζωής του κάθε ατόμου (π.χ. κάπνισμα, χρήση αλατιού και αλκοόλ, παχυσαρκία, σωματική δραστηριότητα). Για την αντιμετώπιση της νόσου απαιτείται η «υιοθέτηση» ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής από τους ασθενείς, ενώ σε περιπτώσεις που οι αλλαγές στον τρόπο ζωής είναι αναποτελεσματικές ή ανεπαρκείς, απαραίτητη είναι και η φαρμακευτική αγωγή (Maham & Escott-Stump, 2000; Ζαμπέλας, 2017).

1.2.2. Συστήματα ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης

Οι τρεις βασικοί ρυθμιστές της αρτηριακής πίεσης είναι το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και ο νεφρός. Τα ρυθμιστικά συστήματα λειτουργούν σε βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη βάση για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης. Η βραχυπρόθεσμη ρύθμιση ελέγχεται κυρίως από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, το οποίο αντιδρά άμεσα σε οξείες μεταβολές της αρτηριακής πίεσης, ενώ ο μακροπρόθεσμος έλεγχος επιτυγχάνεται με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Ζαμπέλας, 2017).

1.2.2.1. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και το ένζυμο ACE

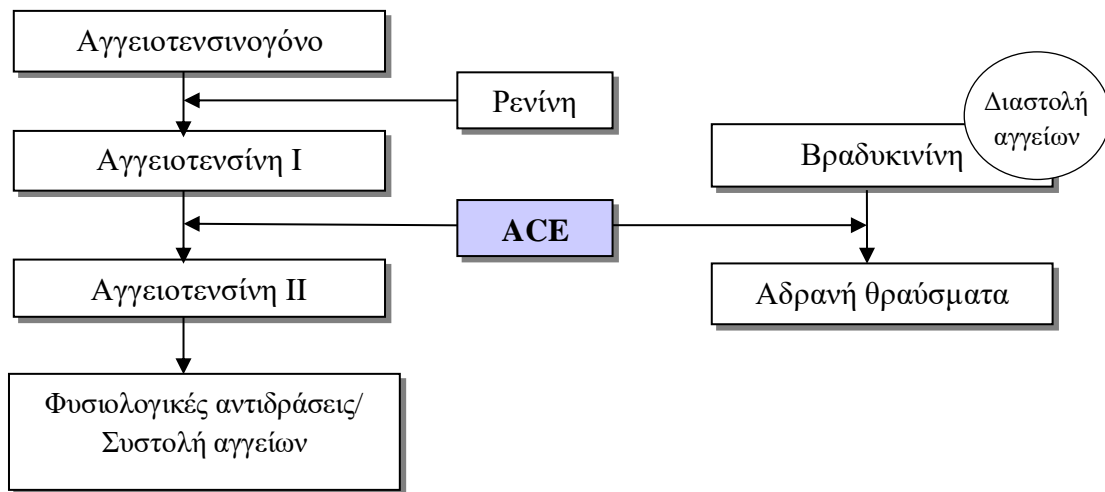
Το σύστημα αυτό (Σχήμα 1.1) αποτελεί ένα από τα βασικότερα συστήματα ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης. Αρχικά ενεργοποιείται το αγγειοτενσινογόνο (πρωτεΐνη του πλάσματος) από την πρωτεολυτική δραστηριότητα της ρενίνης (ένζυμο που εκκρίνεται στη κυκλοφορία του αίματος από συγκεκριμένα κύτταρα του νεφρού όταν η αρτηριακή πίεση είναι μειωμένη), η οποία το μετατρέπει σε αγγειοτενσίνη (AT)-I. Στη συνέχεια, στο πλάσμα του αίματος η (AT)-I μετατρέπεται στην ισχυρά αγγειοσυσταλτική αγγειοτενσίνη (AT)-II μέσω της δράσης του

μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme ή ACE) (Αργύρη, 2015; Brandeli *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2016).

Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια μεταλλοπεπτιδάση (διπεπτιδυλο-καρβοξυ-πεπτιδάση), εξαρτώμενη από τον ψευδάργυρο, το οποίο διασπά τα C-τελικά πεπτιδία διαφόρων ολιγοπεπτιδίων. Βρίσκεται σε πολλούς ιστούς και βιολογικά υγρά των οργανισμών και προσδέεται σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Η πρόσδεση επιτυγχάνεται μέσω δύο ακροδεκτών που διαθέτει, με μεταβλητή συγγένεια προς τα υποστρώματα και/ή τους αναστολείς της (Shalaby *et al.*, 2006; Tomovska *et al.* 2013).

Συνεπώς, το ένζυμο ACE αποσπά ένα διπεπτίδιο από το καρβοξυτελικό άκρο της (AT)-I μετατρέποντάς την σε (AT)-II (Lu *et al.*, 2010). Η (AT)-II δεσμεύεται σε υποδοχείς που βρίσκονται σε ιστούς σε όλο το σώμα και προκαλεί φυσιολογικές αντιδράσεις που οδηγούν σε συστολή των αιμοφόρων αγγείων, διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα την πίεση του αίματος. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις, οι υψηλές συγκεντρώσεις της (AT)-II οδηγούν σε σοβαρές συστολές των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα την υψηλή αρτηριακή πίεση. Επιπλέον, το ένζυμο ACE αδρανοποιεί το ισχυρά αγγειοδιασταλτικό πεπτίδιο, βραδυκινίνη που ασκεί αντιυπερτασική δράση (Haque *et al.*, 2009; Udenigwe & Aluko, 2012; Αργύρη, 2015; Brandeli *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2016; Ζαμπέλας, 2017; Wu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022). Συνεπώς, το ένζυμο ACE διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, ενώ τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της υπέρτασης λειτουργούν παρεμποδίζοντας τη δράση του (Suetsuna & Chen, 2001; Lu *et al.*, 2010; Ζαμπέλας, 2017; Wu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022).

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου *in vitro* συνιστά αποτελεσματική δοκιμαστική μέθοδο της αντιυπερτασικής δράσης διαφόρων ουσιών και φαρμάκων (Henda *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2017). Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων του ενζύμου αποτελούν οι ουσίες καπτοπρίλη, βεναζεπρίλη, εναλαπρίλη, περινδοπρίλη, ραμιπρίλη, λισινοπρίλη κ.α. που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για τη θεραπεία της υπέρτασης και ορισμένων τύπων συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας (Otte *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2022). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία για την αντιυπερτασική της δράση είναι η καπτοπρίλη και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά ως θετικός μάρτυρας σε μελέτες ανασταλτικής δράσης κατά του ACE (Otte *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2017).



Σχήμα 1.1: Σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Προσαρμοσμένο από Αργύρη, 2015).

1.3. Λειτουργικά Τρόφιμα και Βιοενεργά Συστατικά

Η έννοια των «λειτουργικών τροφίμων» (functional foods) πρωτοεμφανίστηκε στην Ιαπωνία στα μέσα της δεκαετίας του 1980, και αφορά μία κατηγορία φυτικών και ζωικών τροφίμων τα οποία εκτός από την κάλυψη των βασικών διατροφικών αναγκών του ανθρώπινου οργανισμού, συμβάλουν επιπλέον στη βελτίωση της υγείας κυρίως μέσω μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών (π.χ. παχυσαρκία, οστεοπόρωση, καρδιακά προβλήματα) ή ενίσχυσης της λειτουργίας ενός συγκεκριμένου συστήματος του οργανισμού (π.χ. ανοσοποιητικού συστήματος). Τα τρόφιμα αυτά αποτελούν μέρος της κανονικής διατροφής και μπορεί να είναι είτε συμβατικά, με σημαντικές ιδιότητες λόγω συγκεκριμένων φυσικών συστατικών που περιέχουν (π.χ. πολυφαινόλες), είτε προϊόντα βιομηχανικής παρέμβασης (π.χ. εμπλουτισμένα με συστατικά όπως βιταμίνες ή στα οποία έχει γίνει αφαίρεση κάποιου συστατικού π.χ. χοληστερόλης, λακτόζης ή γλουτένης), ενώ δεν συμπεριλαμβάνονται τα φάρμακα ή τα ιατρικά τρόφιμα που απευθύνονται αποκλειστικά σε ασθενείς για θεραπεία (Kwak & Jukes, 2001; Jones & Jew, 2007; Κουτελιδάκης, 2015¹; El-Fattah *et al.*, 2018; Lafarga *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2022). Τη τελευταία δεκαετία έχουν δοθεί αρκετοί ορισμοί για τα λειτουργικά τρόφιμα από διάφορους επιστήμονες και ερευνητές. Ένας πρόσφατος ορισμός περιγράφει τα λειτουργικά τρόφιμα ως «βιομηχανοποιημένα τρόφιμα για τα οποία μπορούν να γίνουν επιστημονικά έγκυροι ισχυρισμοί υγείας» (Ali *et al.*, 2022). Στην ενωσιακή νομοθεσία δεν αναφέρεται ο όρος «λειτουργικό τρόφιμο» διότι η Ε.Ε. θεωρεί ότι όλα τα τρόφιμα διαδραματίζουν ένα λειτουργικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, ενδέχεται κάποια τρόφιμα να περιέχουν ή να μην περιέχουν συστατικά που σχετίζονται άμεσα με την υγεία του καταναλωτή (Κρέστος & Ξενάκη, 2015).

Η δράση των λειτουργικών τροφίμων έχει αποδοθεί στη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε βιοενεργά-βιολειτουργικά συστατικά, δηλαδή στα μάκρο- και μικροθρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα) για τα οποία υπάρχουν επαρκώς τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα (από *in vivo* μελέτες σε ζώα, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες) ότι μπορούν να επιτελέσουν μία συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού, και μέσω αυτής να παρέχουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2022). Η εκδήλωση των βιολειτουργικών ιδιοτήτων των συστατικών αυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την βιοπροσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητά τους, δηλαδή την ικανότητά τους να απελευθερώνονται από το τρόφιμο και να είναι προσβάσιμα στον εντερικό σωλήνα, καθώς και να απορροφώνται και να χρησιμοποιούνται σε ικανοποιητικό βαθμό από τον οργανισμό αντίστοιχα (Lucarini, 2017). Εκτός από τα μάκρο- και μικροθρεπτικά συστατικά των τροφίμων, βιοενεργά συστατικά αποτελούν επίσης και άλλες ενώσεις π.χ. χρωστικές, καθώς και προϊόντα διάσπασης των μακροθρεπτικών συστατικών όπως είναι οι ολιγοσακχαρίτες και τα βιοενεργά πεπτίδια (Kanekianan, 2014; Κουτελιδάκης, 2015¹).

1.3.1.Βιοενεργά Πεπτίδια και Προαγωγή της Υγείας

Τα «βιοενεργά» πεπτίδια αποτελούν αλληλουχίες συνήθως 2-20 (ή και περισσότερων) αμινοξέων, συνδεδεμένα με ομοιοπολικούς δεσμούς, που προέρχονται από πρωτεΐνες προϊόντων τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης, και εκτός από την διατροφική τους αξία μπορούν να επηρεάσουν θετικά βιολογικές διεργασίες του οργανισμού και εν τέλει την υγεία (Korhonen & Pihlanto, 2006; Agyei & Danquah, 2012; Udenigwe & Aluko, 2012; Αργύρη, 2015; Santiago-López *et al.*, 2016; Ovando *et al.*, 2018; Chalamaiah *et al.*, 2018; Sedighi *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Ye *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Τα πεπτίδια αυτά είναι ανενεργά εντός της αλληλουχίας της μητρικής πρωτεΐνης και η άσκηση της βιολογικής τους δράσης προϋποθέτει την απελευθέρωσή τους από αυτήν. Γενικότερα, υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται η απελευθέρωση των βιοενεργών πεπτιδίων από την αρχική πρωτεΐνη, όπως 1) μέσω ζύμωσης από πρωτεολυτικές εναρκτήριες καλλιέργειες, 2) μέσω επεξεργασίας του τροφίμου, και 3) μέσω ένζυμο-καταλυόμενης πρωτεόλυσης *in vitro* ή στον γαστρεντερικό σωλήνα μετά την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο από πεπτικά ένζυμα όπως η πεψίνη, η τρυψίνη, η χυμοτρυψίνη και η παγκρεατίνη, και από ένζυμα πρωτεολυτικών μικροοργανισμών (*in vivo*) (Korhonen & Pihlanto, 2006; Agyei & Danquah, 2012; Martínez-Palma *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2016; Chalamaiah *et al.*, 2018; Gallego *et al.*, 2020; Lafarga *et al.*, 2021). Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτά τα προϊόντα

υδρόλυσης των πρωτεϊνών επιδεικνύουν υψηλότερη βιοδραστικότητα σε σχέση με τις πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχονται (Αργύρη, 2015).

Τα πεπτίδια που απελευθερώνονται, ανάλογα με τη πρωτεΐνη προέλευσης, το μέγεθος της πεπτιδικής αλυσίδας, την αλληλουχία των αμινοξέων και την βιοδιαθεσιμότητα τους, μπορούν να επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες του οργανισμού ασκώντας μεταξύ άλλων αντιυπερτασικές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, μεταλλοδεσμευτικές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσορυθμιστικές και αντιμικροβιακές δράσεις παρουσιάζοντας δραστηριότητα όμοια με αυτή των ορμονών ή των βιταμινών (Kim & Wijesekara, 2010; Agyei & Danquah, 2012; Ngo *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014; Kanekanian, 2014; Mohanty *et al.*, 2016; Santiago-López *et al.*, 2016; Ovando *et al.*, 2018; Sedighi *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Ye *et al.*, 2022). Πιο ειδικά, οι δράσεις αυτές εκδηλώνονται είτε τοπικά, όπως η αντιμικροβιακή δράση εντός του γαστρεντερικού σωλήνα, είτε μέσω της πρόσδεσης των πεπτιδίων, που επιβιώνουν της γαστρεντερικής πέψης, σε ειδικούς υποδοχείς των εξωκυτταρικών μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και στη συνέχεια μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται στο όργανο-στόχο (Agyei & Danquah, 2012; Kanekanian, 2014). Μάλιστα, αρκετά από τα βιοενεργά πεπτίδια είναι πολυλειτουργικά και έχουν την ικανότητα να ασκούν περισσότερες από μία από τις προαναφερόμενες δράσεις (Agyei & Danquah, 2012; Udenigwe & Aluko, 2012; Mohanty *et al.*, 2016). Η λειτουργική ιδιότητα των πεπτιδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μοναδική τρισδιάστατη δομή τους (π.χ. παρουσία δισουλφιδικών γεφυρών κυστεΐνης) καθώς και από την υδροφοβικότητα ή την υδροφιλία των αμινοξέων τους. Ωστόσο η ικανότητα δέσμευσης τους σε υποδοχείς κυττάρων έχει αποδοθεί κυρίως στη δευτεροταγή παρά στη τριτοταγή δομή (Agyei & Danquah, 2012). Οι πρωτεΐνες διαφόρων τροφίμων, όπως γάλακτος, τυριού, γιαουρτιού αλλά και φυτικών τροφίμων π.χ. σόγιας, καλαμποκιού, αποτελούν σημαντικές πηγές βιοενεργών πεπτιδίων με πολλαπλές λειτουργικές ιδιότητες (Lu *et al.*, 2010; Agyei & Danquah, 2012; Santiago-López *et al.*, 2016). Έτσι, αρκετές έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν επικεντρωθεί σε μοντέλα *in vitro* προσομοίωσης της γαστρεντερικής πέψης τροφίμων για την εκτεταμένη μελέτη του ρόλου των βιοενεργών πεπτιδίων στην υγεία (Giromini *et al.*, 2019) και τη χρήση τους ως συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής ή συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων (Pihlanto, 2011; Agyei & Danquah, 2012; Αργύρη, 2015; Gallego *et al.*, 2020). Εκτενέστερα έχουν μελετηθεί πεπτίδια με αντιυπερτασικές ιδιότητες, ενώ μεγάλης σημασίας για την αντιμετώπιση και πρόληψη χρόνιων και μη παθήσεων αποτελεί η δράση των ανοσορυθμιστικών πεπτιδίων που περιγράφεται παρακάτω (Agyri *et al.*, 2012; Santiago-López *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

1.3.1.1. Πεπτίδια με ανοσορυθμιστική δράση

Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αποτελέσει αιτία πολυάριθμων ασθενειών. Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει τη λειτουργία του συστήματος αυτού είναι η διατροφή, καθώς μέσω αυτής στον οργανισμό παρέχονται συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία) που ενισχύουν τη λειτουργία του, ενώ η έλλειψή τους μπορεί να την επιδεινώσει (Chanput, 2012; Scrimshaw & San Giovanni, 1997). Πρωτεΐνες πολλών τροφίμων αποτελούν πηγή ανοσορυθμιστικών πεπτιδίων και ενώ οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες ορού του γάλακτος συνιστούν τις πιο μελετημένες πηγές, *in vivo* και *in vitro* αναλύσεις έχουν ταυτοποιήσει κι άλλες πηγές πρωτεϊνών ως πιθανές πρόδρομες ενώσεις των πεπτιδίων αυτών συμπεριλαμβανομένου του ρυζιού, αυγών, σιταριού και ορισμένων θαλάσσιων οργανισμών (Santiago-López *et al.*, 2016).

Ο μηχανισμός δράσης των ανοσορυθμιστικών πεπτιδίων περιλαμβάνει τόσο την ανοσοκαταστολή όσο και την ανοσοδιέγερση. Η ανοσοκατασταλτική δράση λαμβάνει χώρα σε καταστάσεις φλεγμονής και αυτοάνοσες διαταραχές, ενώ η ανοσοδιέγερση ενισχύει τη συνολική ανοσοποιητική ισχύ επιδρώντας τόσο στο ειδικό, όσο και στο μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, τα πεπτίδια ρυθμίζουν την έκφραση προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών, τα οποία με τη σειρά τους συμβάλλουν είτε στην ενίσχυση είτε στην αποδυνάμωση αντίστοιχα, των βασικών λειτουργιών των ανοσοκυττάρων όπως είναι η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων, η παραγωγή αντισωμάτων, η έκφραση άλλων κυτοκινών, χημειοκινών και ιντερλευκινών καθώς και η φαγοκυτταρική δράση των μακροφάγων (Korhonen & Pihlanto, 2006; Pihlanto, 2011; Agyei & Danquah, 2012; Chanput, 2012; Mohanty *et al.*, 2016; Santiago-López *et al.*, 2016; Theodorou & Politis, 2016).

Τα ανοσοπεπτίδια έχουν πιθανές εφαρμογές στη χρήση τους ως συμπληρώματα για τη συντήρηση της υγείας του ανοσοποιητικού συστήματος, και ενδεχομένως να παρέχουν προστασία έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς και παράσιτα. Ωστόσο η σχέση που υφίσταται μεταξύ της δομής και της δραστηριότητας των πεπτιδίων καθώς και οι μηχανισμοί της ανοσορυθμιστικής τους δράσης απαιτούν ευρύτερη μελέτη. Έχει προταθεί πως η αργινίνη στο N- ή C- τελικό άκρο των πεπτιδίων αποτελεί σημαντικό δομικό στοιχείο που αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς πρόσδεσης στη μεμβράνη των ανοσοκυττάρων (Haque *et al.*, 2009).

1.3.1.2. Πεπτίδια με αντιυπερτασική δράση

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ, 2017) οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν τη βασικότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ένας από τους κύριους παράγοντες για την ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου όπως προαναφέρθηκε είναι η αυξημένη αρτηριακή πίεση (Brandeli *et al.*, 2015; Αργύρη, 2015; Ζαμπέλας, 2017; Anekthanakul *et al.*, 2019). Τα πεπτίδια που προέρχονται από την υδρόλυση πρωτεϊνών διαφόρων τροφίμων, έχει αναφερθεί πως παρουσιάζουν αντιυπερτασική δράση μέσω της παρεμπόδισης της δράσης του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme ή ACE) στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Lu *et al.*, 2010). Επομένως, με βάση τους ρόλους του ACE στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (**Ενότητα 1.2.2.1**), παρεμποδιστές αυτού του ενζύμου, όπως είναι τέτοια πεπτίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιυπερτασικοί παράγοντες, αποτρέποντας τη σύνθεση της αγγειοσυσταλτικής αγγειοτενσίνης II (η οποία συμβάλει στην εξέλιξη της υπέρτασης) και παρεμποδίζοντας την αδρανοποίηση της αγγειοδιασταλτικής βραδυκινίνης (Haque *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Udenigwe & Aluko, 2012; Αργύρη, 2015; Mohanty *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Anekthanakul *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Επιπλέον, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες πεπτίδια τροφίμων μπορεί να εμπλέκονται και στο στάδιο ενεργοποίησης του αγγειοτενσινογόνου αναστέλλοντας τη δράση της ρενίνης (Αργύρη, 2015). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα πεπτίδια με ACE-παρεμποδιστική δράση.

Ο κύριος μηχανισμός παρεμπόδισης της δράσης του ενζύμου ACE έχει βρεθεί ότι είναι η ανταγωνιστική παρεμπόδιση. Τα πεπτίδια συνδέονται στο ένζυμο, χωρίς να υδρολύονται από αυτό, σχηματίζοντας σύμπλοκο ενζύμου-παρεμποδιστή. Με αυτόν τον τρόπο ανταγωνίζονται το υπόστρωμα για τα ενεργά κέντρα του ενζύμου και ως εκ τούτου παρεμποδίζεται η σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος. Τα πεπτίδια αυτά καλούνται «πραγματικοί παρεμποδιστές» (Tomovska *et al.*, 2013). Ωστόσο, ορισμένα πεπτίδια επιδεικνύουν μη ανταγωνιστικούς τρόπους δράσης καθώς δεν συνδέονται με την ενεργό περιοχή, αλλά με κάποια άλλη περιοχή της επιφάνειας του ενζύμου, μειώνοντας έτσι τελικά την καταλυτική του δράση (Sato *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2022). Άλλα πεπτίδια λειτουργούν ως υπόστρωμα για το ένζυμο, με αποτέλεσμα η υδρόλυσή τους από αυτό να απελευθερώνει νέα πεπτίδια με μεγαλύτερη ή χαμηλότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το αρχικό. Τα πεπτίδια με μεγαλύτερη ανασταλτική δράση καλούνται «αναστολείς τύπου προφαρμάκου» ενώ εκείνα με μικρότερη δράση ονομάζονται «αναστολείς τύπου υποστρώματος» (Tomovska *et al.*, 2013). Ένα κοινό χαρακτηριστικό των πεπτιδίων με ανασταλτική δράση κατά του ACE είναι η μικρή μοριακή τους μάζα (Tomovska *et al.*, 2013).

Για να ασκηθεί η αντιυπερτασική δράση των πεπτιδίων μετά τη λήψη τους, πρέπει αυτά να φτάσουν στο καρδιαγγειακό σύστημα σε ενεργή μορφή, δηλαδή να παραμείνουν ενεργά μετά

την πέψη από τις πρωτεάσες. Τα πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ προλίνη φαίνεται πως είναι πιο ανθεκτικά στα πεπτικά ένζυμα (Haque *et al.*, 2009). Σύμφωνα με τους Wu *et al.*, 2006 και Garcia-Mora *et al.* 2017 πεπτίδια που περιλαμβάνουν στη δομή τους τα υδρόφοβα καρβοξυτελικά αμινοξέα τρυπτοφάνη (Trp), τυροσίνη (Tyr), φαινυλαλαλίνη (Phe), προλίνη (Pro) καθώς και τα αμινοτελικά λευκίνη (Leu), ισολευκίνη (Ile), βαλίνη (Val) προσδένονται σε αρκετές υπομονάδες του ενζύμου με αποτέλεσμα να το παρεμποδίζουν. Επίσης, αμινοξέα με θετικό φορτίο στην ε-αμινομάδα, όπως αργινίνη (Arg) και λυσίνη (Lys) συνεισφέρουν στην αναστολή του ACE εφόσον βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων (Αργύρη, 2015). Επιπλέον, η παρουσία αρωματικών κατάλοιπων στο καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων, τα καθιστά καλύτερους ACE-αναστολείς συγκριτικά με την απουσία τους (Cavalheiro *et al.*, 2020). Γενικά, τα ανασταλτικά πεπτίδια του ACE δεν είναι τόσο ισχυρά όσο τα φάρμακα με ίδια δράση που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της υπέρτασης (π.χ. καπτοπρίλη, εναραπρίλη, ραμιπρίλη κ.α.) αλλά αποτελούν έναν ασφαλή και φυσικό θεραπευτικό παράγοντα χωρίς παρενέργειες (Haque *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Mohanty *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Anekthanakul *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022).

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των πεπτιδίων αυτών, πραγματοποιείται μέσω *in vitro* και *in vivo* μεθόδων αφού προηγηθεί ενζυμική υδρόλυση των πηγών πρωτεΐνης (*parent proteins*). Η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου για την υδρόλυση της πρωτεΐνης είναι ένας βασικός παράγοντας για τη λήψη πεπτιδίων που εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα αναστολής του ACE. Η τρυψίνη φαίνεται να είναι ένα πολλά- υποσχόμενο ένζυμο για την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων με αντιυπερτασική δράση καθώς βελτιώνει και την πεπτικότητα της πρωτεΐνης (Tomovska *et al.* 2013; Brandeli *et al.*, 2015). Τέλος, δεδομένου ότι τα περισσότερα ACE παρεμποδιστικά πεπτίδια χαρακτηρίστηκαν με βάση την *in vitro* δράση τους, η ακριβής συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του ACE και της φυσιολογικής αντιυπερτασικής δράσης δεν είναι εμφανής καθώς παρεμβάλλονται και άλλοι μηχανισμοί δράσης (Wu *et al.*, 2017).

1.4. Μικροφύκη (Μικροάλγη)

Τα μικροφύκη ή μικροάλγη αποτελούν μία κατηγορία μονοκύτταρων, φωτοσυνθετικών, ευκαρυωτικών ή προκαρυωτικών μικροοργανισμών που ανευρίσκονται κυρίως σε υδάτινα συστήματα και ποικίλουν ως προς τη μορφολογία, το μέγεθος και το χρώμα. Σήμερα έχουν αναλυθεί περίπου 40.000 είδη μικροφυκών και τα περισσότερα ανήκουν στο βασίλειο των πρωτίστων (αναμένονται αλλαγές στη φυλογενετική τους κατάταξη). Έχουν αναγνωριστεί ως μία από τις παλαιότερες μορφές ζωής στον πλανήτη με σημαντική συμβολή στην παραγωγή ατμοσφαιρικού οξυγόνου και την αξιοποίηση του διοξειδίου του άνθρακα. Η ανάπτυξή τους

προϋποθέτει την κάλυψη αναγκών σε φως, διοξείδιο του άνθρακα και θρεπτικά συστατικά (κυρίως N, P, K) (Brennan & Owende, 2010; Μουντζούρης, 2021).

Τα τελευταία χρόνια, η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού και η πίεση που ασκεί αυτή στους διαθέσιμους πόρους, έχει οδηγήσει στην εκτενέστερη μελέτη και αξιοποίηση των μικροφυκών (Torres-Tijj *et al.*, 2020). Η ικανότητά τους να αναπτύσσονται πολύ γρήγορα, οι ιδιαιτερότητες της σύστασης των κυττάρων τους καθώς και των εξωκυτταρικών τους προϊόντων τα καθιστά σημαντικά για εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως στα τρόφιμα, (ενίσχυση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων, παραγωγή θρεπτικών συστατικών π.χ. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες κ.τ.λ.) και τις ζωοτροφές (χρήση στις υδατοκαλλιέργειες ως τροφή για ψάρια), στα λιπάσματα, φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα καθώς και στην προστασία του περιβάλλοντος (π.χ. παραγωγή βιοκαυσίμων) (Spolaore *et al.*, 2006; Ravindran *et al.*, 2016; Μουντζούρης, 2021). Στον τομέα των τροφίμων και της διατροφής, η υψηλή πρωτεϊνική σύνθεση των μικροφυκών, το καλά ισορροπημένο προφίλ των αμινοξέων τους καθώς και το πλήθος των βιολειτουργικών συστατικών που περιέχουν, οδήγησε στην αξιοποίησή τους ως εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών για εμπλουτισμό συμβατικών τροφίμων, στην παραγωγή συμπληρωμάτων καθώς και ως συστατικά λειτουργικών προϊόντων (Morris *et al.*, 2009; Sedighi *et al.*, 2009). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Torres-Tijj *et al.* (2020) η καθιέρωση των μικροφυκών ως νέα τρόφιμα, ενδεχομένως να δώσει λύσεις στο πρόβλημα υποσιτισμού που στιγματίζει 1 στους 9 ανθρώπους παγκοσμίως. Ωστόσο, η σύσταση των μικροφυκών δεν είναι σταθερή και επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος, τις συνθήκες καλλιέργειας και συγκομιδής καθώς και τον τρόπο επεξεργασίας τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν.

Τα προκαρυωτικά μικροφύκη (κυανοβακτήρια ή κυανόφυτα) δεν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα και στερούνται μεμβρανικών οργανιδίων (π.χ. μιτοχόνδρια, σύμπλεγμα Golgi) με αποτέλεσμα να μοιάζουν περισσότερο με βακτήρια παρά με φύκη. Ωστόσο, ανήκουν στην κατηγορία των μικροφυκών καθώς διαθέτουν φωτοσυνθετική ικανότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κυανοβακτηρίου αποτελεί η *Arthrospira (Spirulina)*. Αντιθέτως, στα ευκαρυωτικά μικροφύκη η παρουσία αυτών των οργανιδίων συμβάλει στον έλεγχο διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών επιτρέποντάς τους την επιβίωση και αναπαραγωγή. Επιπλέον, τα ευκαρυωτικά μικροφύκη κατηγοριοποιούνται σε πολλές κλάσεις με βάση τον χρωματισμό, τον κύκλο ζωής και την βασική κυτταρική τους δομή. Οι πιο σημαντικές κλάσεις είναι: τα πράσινα άλγη (Χλωρόφυτα), τα κόκκινα άλγη (Ροδόφυτα) και τα διάτομα (Βασιλαριόφυτα) (Brennan & Owende, 2010). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο μικροφύκη, το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis*, και το Χλωρόφυτο *Chlorella vulgaris*, τα οποία σύμφωνα με τους Brennan & Owende (2010) και Vigani *et al.* (2015) αποτελούν τα σημαντικότερα φύκη στον τομέα των τροφίμων με τους μεγαλύτερους όγκους παραγόμενης ξηρής ύλης το έτος για ανθρώπινη

κατανάλωση παγκοσμίως (5000 τόνοι/έτος για σπιρουλίνα και 2000 τόνοι/ έτος για χλωρέλλα).
Στον παρακάτω **Πίνακα 1.1.** παρατίθενται τα στοιχεία ταξινόμησης των δύο μικροφυκών.

Πίνακας 1.1: Στοιχεία ταξινόμησης των μικροφυκών *Spirulina Platensis* και *Chlorella vulgaris* (Προσαρμοσμένο από Safi *et al.*, 2014).

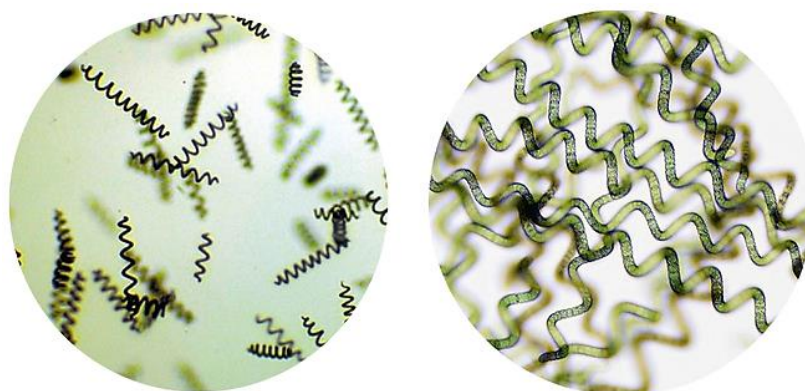
| | Βασίλειο | Φυλή | Κλάση | Τάξη | Οικογένεια | Γένος | Είδος |
|--------------|----------|------------------|--------------|-----------------|---------------|------------|---------------------|
| Προκαρυωτικά | Bacteria | Cyanobacteria | Cyanophyceae | Oscillatoriales | Phormidiaceae | Athrospira | Spirulina platensis |
| Ευκαρυωτικά | Protista | Trebouxiophyceae | Chlorellales | Chlorellales | Chlorellaceae | Chlorella | Chlorella vulgaris |

1.4.1. Σπιρουλίνα (*Arthrospira-Spirulina*)

Η σπιρουλίνα (γνωστή και ως σπειρουλίνα) αποτελεί βρώσιμο φύκος, κυανό-πράσινου χρώματος που ανήκει στα κυανοβακτήρια και διαθέτει φωτοσυνθετική ικανότητα. Αναπτύσσεται φυσικά σε αλκαλικές λίμνες (pH 8,5-11), πλούσιες σε μέταλλα, ανθρακικά και όξινα ανθρακικά άλατα, αξιοποιώντας το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) στο νερό ως πηγή άνθρακα, ενώ παράλληλα ευνοείται από συνθήκες έντονης ηλιοφάνειας και υψηλών θερμοκρασιών (30 °C). Η φωτοσυνθετική της δραστηριότητα οφείλεται στις χρωστικές χλωροφύλλη (που προσδίδει το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα) και στη φυκοκυανίνη (που προσδίδει κυανό χρώμα στο φύκος). Οι χρωστικές αυτές δεσμεύουν την ηλιακή ακτινοβολία και την αξιοποιούν ως πηγή ενέργειας καθιστώντας τη σπιρουλίνα αυτότροφο μικροοργανισμό. Με τον όρο σπιρουλίνα (*Spirulina*) γενικότερα γίνεται αναφορά σε ένα σύνολο βακτηρίων που εντάσσονται στα κυανοβακτήρια. Σήμερα ωστόσο, το όνομα χρησιμοποιείται ειδικότερα για να περιγράψει τα εμπορικά διαθέσιμα βρώσιμα φύκη του γένους Αρθροσπείρα (*Arthrospira*), από τα οποία τα πιο γνωστά και καλλιεργούμενα είναι τα είδη *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* και *Arthrospira fusiformis* (Belay *et al.*, 1993; Vonshak & Tomaselli, 2000; Sanchez *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005; Habib *et al.*, 2008; Kagwwa *et al.*, 2013; Saranraj & Sivasakthi, 2015; Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2020).

Από μορφολογικής άποψης, η σπιρουλίνα αποτελείται από πολυάριθμα προκαρυωτικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια (μεγέθους 3-16 μm) που σχηματίζουν αποικίες υπό μορφή σπειροειδών νηματίων (μήκους έως και 20 mm) με αριστερόστροφη έλικα, στην οποία έχει αποδοθεί και το όνομά της (Ciferri, 1983; Vonshak & Tomaselli, 2000; Sanchez *et al.*, 2003). Η ελικοειδής μορφή της σπιρουλίνας διατηρείται κυρίως σε υγρά μέσα ενώ σε στερεή μορφή τα νήματα γίνονται σπείρες (**Εικόνα 1.2**) (Ciferri, 1983). Σύμφωνα με τους Giordanino *et al.*, (2011) και Kagwwa *et al.* (2013) οι διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, η ένταση του φωτός,

η αλατότητα καθώς και η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος της σπιρουλίνας επιδρούν στη γεωμετρία της έλικας και στα μορφολογικά της χαρακτηριστικά (π.χ. μήκος νήματος, αριθμός σπειρών). Το κυτταρικό της τοίχωμα αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες.



Εικόνα 1.2: Η σπιρουλίνα όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Διαθέσιμο στο: <http://www.kovaiagrofarmas.in/spirulina-introduction/> -Αριστερή εικόνα και <https://www.freshspirulina.com.au/spirulina/spirulina-under-the-microscope/> -Δεξιά εικόνα).

Ο μικροοργανισμός αυτός αποτελεί μία από τις αρχαιότερες μορφές ζωής που αναπτύσσεται στον πλανήτη μας τα τελευταία 3,5 δισεκατομμύρια έτη, συμβάλλοντας σημαντικά στην παροχή οξυγόνου. Στους φυσικούς βιότοπους της σπιρουλίνας περιλαμβάνονται ο Ειρηνικός Ωκεανός κοντά στην Ιαπωνία και τη Χαβάη, η λίμνη Τσαντ στην Αφρική, η λίμνη Klamath στη Βόρεια Αμερική, η λίμνη Texcoco στο Μεξικό καθώς και η λίμνη Titikala στη Νότια Αμερική (Ciferri & Tiboni, 1985; Belay *et al.*, 1993; Schopf, 2002; Khan *et al.*, 2005; Habib *et al.*, 2008; Kulshreshtha *et al.*, 2008; Saranraj & Sivasakthi, 2015; Soni *et al.*, 2017). Για πολλά χρόνια η σπιρουλίνα αποτελούσε παραδοσιακή τροφή για τους αρχαίους λαούς των περιοχών κοντά στις λίμνες αυτές, ενώ ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Ισπανό εξερευνητή Hernando Cortez και τους ερευνητές του το 1519. Ο Cortez παρατήρησε ότι η σπιρουλίνα καταναλώνονταν από τους Αζτέκους κατά την επίσκεψή του στη λίμνη Texcoco στη κοιλάδα του Μεξικού (Farrar, 1966; Belay *et al.*, 1983; Belay, 2008; Soni *et al.*, 2017). Επίσης, από μελέτες που διεκπεραιώθηκαν βρέθηκε πως οι γυναίκες της φυλής Kanembu συλλέγαν την σπιρουλίνα από τη λίμνη Τσαντ, την αποξηράναν, την έκοβαν σε μικρά τετράγωνα κομμάτια (dihe) και την κατανάλωναν ή την πουλούσαν κυρίως για την παρασκευή ζωμών για κρέας, ψάρι ή λαχανικά (Abdulqader *et al.*, 2000; Habib *et al.*, 2008; Kulshreshtha *et al.*, 2008). Ωστόσο, παρά την ιστορία της η σπιρουλίνα ανακαλύφθηκε ξανά από τους επιστήμονες περίπου τα τελευταία 30 χρόνια ως ένα πλήρες τρόφιμο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (Habib *et al.*, 2008).

Σήμερα η σπιρουλίνα καλλιεργείται και παράγεται σε πολλές χώρες παγκοσμίως (κυρίως Αμερική, Αυστραλία και Ασία) εντός φωτοβιοαντιδραστήρων ή μεγάλων υπαίθριων δεξαμενών υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, φωτισμού, περιεκτικότητας αλάτων, ανάδευσης και παροχής διοξειδίου του άνθρακα (Khan *et al.*, 2005; Habib *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2017). Στην Ελλάδα καλλιεργείται στην περιοχή Νιγρίτας του νομού Σερρών λόγω καταλληλότητας της περιοχής. Στο εμπόριο το μικροφύκος διατίθεται ως τρόφιμο ή συμπλήρωμα διατροφής υπό τη μορφή κυρίως σκόνης/νιφάδων, δισκίων και κάψουλας παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της σύστασής του (Khan *et al.*, 2005; Lafarga, 2019a).

Συγκεκριμένα, η σπιρουλίνα αποτελείται κατά 50-70% από πρωτεΐνες, 15-25% υδατάνθρακες, 6-8% λιπαρά, 3-4% φυτικές ίνες ενώ ταυτόχρονα συνιστά σημαντική πηγή μετάλλων (σίδηρος, ασβέστιο, χρώμιο, χαλκός, μαγγάνιο, ψευδάργυρος, κάλιο, μαγνήσιο), ιχνοστοιχείων και βιταμινών (A, B, E, K). Επιπλέον διαθέτει απαραίτητα λιπαρά οξέα όπως γ-λινολενικό οξύ (GLA), απαραίτητα αμινοξέα και βιοδιαθέσιμες χρωστικές (χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη και β-καροτένιο) με αρκετά ωφέλη για την υγεία του ανθρώπου (Khan *et al.*, 2005, Κουτελιδάκης, 2015²; Saranraj & Sivasakthi, 2015; Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2020). Η αυτόνομη δράση των πολυάριθμων μικρο- και μακροθρεπτικών συστατικών της σπιρουλίνας καθώς και η φυσική τους συνέργεια, έχουν οδηγήσει στον χαρακτηρισμό της ως υπερτροφή (superfood) με ολοένα και περισσότερες έρευνες να πιστοποιούν τις ευεργετικές ιδιότητές της στον ανθρώπινο οργανισμό (Κουτελιδάκης, 2015²; Lafarga, 2019a). Πιο ειδικά, έχουν τεκμηριωθεί ιδιότητες όπως αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, ανοσορρυθμιστικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-ικές, αντιοξειδωτικές και αντιυπερτασικές που αποδίδονται στα βιοενεργά συστατικά της και αυξάνουν τις προοπτικές για τη χρήση της στην παραγωγή καινοτόμων λειτουργικών προϊόντων (Belay *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 2005; Habib *et al.*, 2008; Kulshreshtha *et al.*, 2008; Ovando *et al.*, 2018; Lafarga *et al.*, 2020). Εκτός από αυτά, ένα επιπλέον διατροφικό πλεονέκτημα της σπιρουλίνας είναι το γεγονός ότι σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά πράσινα μικροφύκη, από το κυτταρικό της τοίχωμα απουσιάζει η κυτταρίνη με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η πέψη της και να απορροφάται σε υψηλό ποσοστό, περίπου 86%, από τον οργανισμό (Soni *et al.*, 2017; Μουντζούρης Κ., 2021).

Όσον αφορά την απόδοση της σπιρουλίνας, ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας είναι ιδιαίτερα υψηλή και η καλλιέργειά της απαιτεί λιγότερο νερό (όχι απαραίτητα πόσιμο) ανά κιλό παραγόμενης πρωτεΐνης, σε σχέση με άλλα σημαντικά προϊόντα που παράγονται τόσο για ανθρώπινη κατανάλωση όσο και ως ζωοτροφή και απαιτούν μεγάλες εκτάσεις γης αλλά και τεράστιες ποσότητες νερού (π.χ. 25%, 17% και 2% λιγότερο νερό συγκριτικά με τη σόγια, τον αραβόσιτο και το βόειο κρέας αντίστοιχα) (Μουντζούρης Κ., 2021).

Όλα τα παραπάνω, έχουν συντελέσει στο να χαρακτηριστεί η σπιρουλίνα ως το καλύτερο προϊόν για την υγεία της ανθρωπότητας από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως η τροφή του μέλλοντος από την UNESCO και την Διεθνή Ένωση Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας (International Association of Applied Microbiology, IAAM), και ως η καλύτερη και ασφαλής (Generally Recognized As Safe, GRAS) φυτική πηγή πρωτεΐνης από τον FDA (Food and Drug Administration) (Khan *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2020). Επιπροσθέτως, σύμφωνα με την NASA και την Ευρωπαϊκή διαστημική υπηρεσία η σπιρουλίνα είναι ένα από τα κύρια τρόφιμα που μπορούν να καλλιεργηθούν και να καταναλωθούν μακροπρόθεσμα στις μακροχρόνιες διαστημικές αποστολές, καθώς μικρή ποσότητα είναι ικανή να παρέχει ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών συστατικών (Tadros, 1988; Khan *et al.*, 2005). Τέλος, εκτός από τη χρήση της στην ανθρώπινη διατροφή, η σπιρουλίνα βρίσκει εφαρμογή ως πρόσθετο ζωοτροφών, καλλυντικών και φαρμάκων (Henrikson, 1989; Soni *et al.*, 2017; Μουντζούρης Κ., 2021).

1.4.1.1. Καλλιέργεια και Παραγωγή Σπιρουλίνας

Η παραγωγή της σπιρουλίνας, ως εμπορικό διατροφικό προϊόν, πραγματοποιείται τα τελευταία 20 περίπου χρόνια σε διάφορα μέρη του κόσμου, σε ποσότητες που σε παγκόσμια κλίμακα ξεπερνούν τους 3.000 τόνους ετησίως (περίπου 5000 τόνοι/έτος) (Bharathiraja *et al.*, 2015; Jayati *et al.*, 2015; Vigani *et al.*, 2015). Ορισμένες εταιρίες παράγουν το μικροφύκος απ' ευθείας από τις φυσικές λίμνες ενώ άλλες χρησιμοποιούν κατάλληλα διαμορφωμένες υδάτινες καλλιέργειες στις οποίες η ανάπτυξη του φύκου γίνεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα συστήματα καλλιέργειας των μικροφυκών μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους: 1) τους ανοιχτούς και 2) κλειστούς τύπους καλλιέργειας. Στη πρώτη περίπτωση, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι και λίμνες, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η καλλιέργεια πραγματοποιείται εντός διαφόρων μορφών κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors-PBR). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες διαχωρίζουν πλήρως την καλλιέργεια από το εξωτερικό περιβάλλον με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του φύκου να στηρίζεται αποκλειστικά στις ειδικά διαμορφωμένες συνθήκες εντός του φωτοβιοαντιδραστήρα. Άλλο ένα σύστημα καλλιέργειας που εφαρμόζεται είναι το υβριδικό, το οποίο αποτελεί συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων τύπων καλλιέργειας (Singh & Sharma, 2012; Soni *et al.*, 2017). Το 98% της παγκόσμιας παραγωγής σπιρουλίνας προέρχεται από χώρες όπως Αμερική (κυρίως Χαβάη και Καλιφόρνια) (**Εικόνα 1.3**), Ινδία και Κίνα που καλλιεργούν τη σπιρουλίνα σε ανοιχτές δεξαμενές (Habib *et al.*, 2008). Στην Ευρώπη μεγάλης έκτασης εμπορική παραγωγή σπιρουλίνας παρατηρείται

κυρίως στην Ελλάδα με καλλιέργεια της σπιρουλίνας σε ανοιχτές δεξαμενές εντός θερμοκηπίων.



Εικόνα 1.3: Εγκαταστάσεις εντατικής παραγωγής σπιρουλίνας στην Καλιφόρνια (αριστερά) και στη Χαβάη (δεξιά) (Habib *et al.* 2008).

I. Ανοιχτού τύπου καλλιέργειες

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ανοιχτής καλλιέργειας είναι οι αναδεδυόμενες τεχνητές δεξαμενές σε μορφή επιμήκους (raceway) ή κυκλικής λεκάνης (**Εικόνα 1.4**). Η ανάδευση των αγωγών/διαδρόμων της επιμήκους λεκάνης επιτυγχάνεται κυρίως με περυγωτό τροχό (paddle wheel) ενώ της κυκλικής με κινούμενο βραχίονα (Ugwu *et al.*, 2008). Το σύστημα ανάδευσης των ανοιχτών καλλιεργειών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της καλλιέργειας καθώς αποτρέπει την καθίζηση των μικροφυκών, ομογενοποιεί το υπόστρωμα καθιστώντας τα διαλυτά ανόργανα και οργανικά συστατικά πιο διαθέσιμα για τα μικροφύκη και συμβάλει στην καλύτερη αξιοποίηση της ηλιακής ακτινοβολίας (Chaumont, 1993). Μία επιπλέον βασική παράμετρος των ανοιχτών δεξαμενών είναι το βάθος τους το οποίο πρέπει να επιτρέπει τη διέλευση του φωτός ενώ ταυτόχρονα δεν πρέπει να επιτρέπει μεγάλες μεταβολές στη συγκέντρωση των αλάτων του υποστρώματος λόγω εξάτμισης του νερού. Σύμφωνα με τον Borowitzka (1999) το βέλτιστο βάθος μιας δεξαμενής κυμαίνεται μεταξύ 20-30 cm, ενώ παραλλάσσεται ανάλογα το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής.



Εικόνα 1.4: Ανοιχτού τύπου καλλιέργειες για παραγωγή μικροφυκών σε μορφή επιμήκους (αριστερά) και κυκλικής λεκάνης (δεξιά) (Habib *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2017).

Οι ανοιχτού τύπου καλλιέργειες έχουν πιο απλή κατασκευή και λειτουργία συγκριτικά με τις κλειστού τύπου, με αποτέλεσμα να έχουν και χαμηλότερο κόστος εγκατάστασης και παραγωγής (Soni *et al.*, 2017). Ωστόσο, αυτού του τύπου καλλιέργειες εκθέτουν τα μικροφύκη στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως νερά της βροχής, φύλλα, σκόνη, έντομα, πτηνά και τρωκτικά που αποτελούν φορείς μικροοργανισμών και βακτηρίων τα οποία μπορούν να επιμολύνουν την καλλιέργεια. Επιπλέον, η καλλιέργεια μπορεί να επιμολυνθεί και από άλλα είδη μικροφυκών (πέρα από το καλλιεργούμενο είδος) τα οποία πιθανόν να μην είναι βρώσιμα ή να εμφανίζουν τοξικότητα. Οι ευνοϊκές συνθήκες που επικρατούν στη καλλιέργεια πιθανόν να επιτρέψουν την υπέρμετρη αύξηση των μικροφυκών-ξενιστών/βακτηρίων με αποτέλεσμα αυτά να επικρατήσουν έναντι της αρχικής καλλιέργειας ή να αναπτυχθούν συμβιωτικά με αυτήν. Απόρροια αυτού μπορεί να αποτελέσει η μείωση της παραγωγής καθώς και η υποβάθμιση της ποιότητας και ασφάλειας του τελικού προϊόντος (Day *et al.*, 2012; Singh & Sharma, 2012; Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2021).

Η εξάρτηση της ανάπτυξης των μικροφυκών από παράγοντες όπως η τοποθεσία, η εποχή του έτους και η θερμοκρασία αποτελούν ένα επιπλέον ελάττωμα των ανοιχτών καλλιεργειών. Οι υψηλές θερμοκρασίες προκαλούν σημαντικές απώλειες νερού λόγω εξάτμισης με συνέπεια να δημιουργούν την ανάγκη αναπλήρωσής του και χρήση μεγάλων ποσοτήτων του. Εντούτοις, ανάλογα το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και την ανεκτικότητα του στα άλατα, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης μη πόσιμου και μη αρδεύσιμου (αλμυρού/υφάλμυρου) νερού. Πρόβλημα για την ανοιχτή καλλιέργεια συνιστούν και οι έντονες εποχιακές περιβαλλοντικές διακυμάνσεις, κυρίως χαμηλές θερμοκρασίες και περιορισμένη ηλιοφάνεια, σε ορισμένα μέρη, διότι μειώνουν την απόδοση σε παραγόμενη βιομάζα έως και 10 φορές σε σχέση με περιοχές

με υψηλότερες θερμοκρασίες και εκτεταμένη ηλιοφάνεια (Brányiková *et al.*, 2011; Soni *et al.*, 2017).

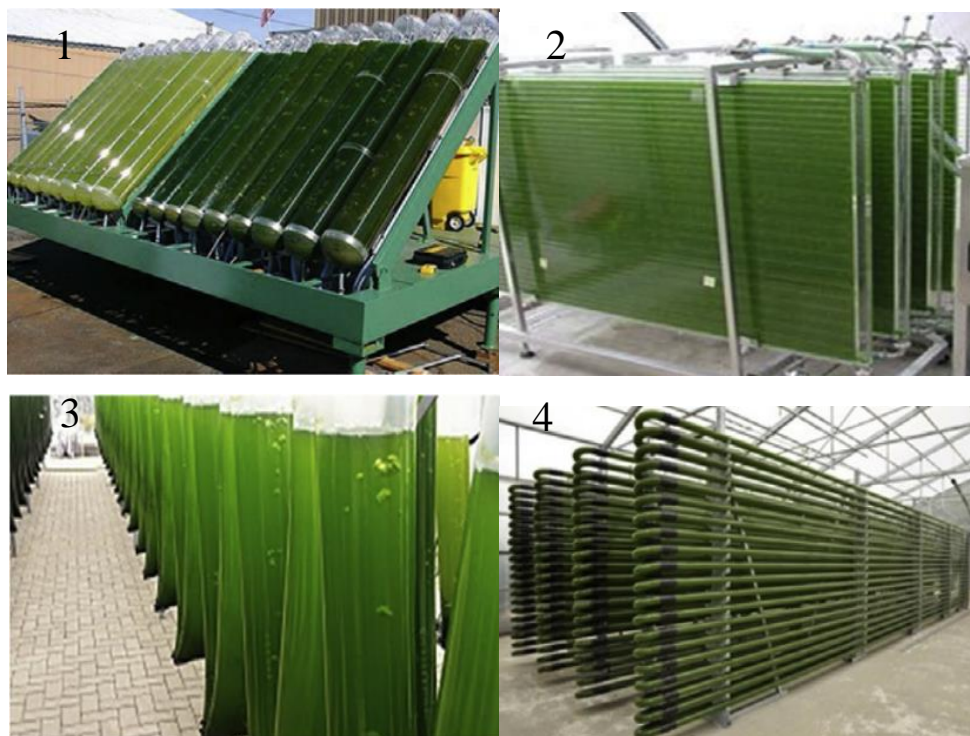
Άλλα μειονεκτήματα αυτού του τύπου καλλιέργειας είναι α) η μειωμένη παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας σε σύγκριση με τις κλειστές καλλιέργειες, β) είναι κατάλληλο για καλλιέργεια ορισμένων μόνο ειδών μικροφυκιών (μεταξύ των οποίων είναι και η σπιρουλίνα), γ) απαιτεί μεγάλες εκτάσεις γης, δ) προκαλεί διάχυση μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και ε) ο μικρός βαθμός αξιοποίησης της ηλιακής ενέργειας (Brennan & Owende, 2010; Soni *et al.*, 2017). Για τον καλύτερο έλεγχο και αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων αναπτύχθηκαν οι καλλιέργειες ανοιχτού τύπου εντός θερμοκηπίων που τις προστατεύουν από ανεπιθύμητες καιρικές συνθήκες και επιμολύνσεις καθώς και οι κλειστού τύπου καλλιέργειες.

II. Κλειστού τύπου καλλιέργειες

Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες ανήκουν οι φωτοβιοαντιδραστήρες, που αποτελούν κλειστούς περιέκτες σχεδιασμένους για ελεγχόμενη παραγωγή βιομάζας μικροφυκών. Αυτός ο τύπος καλλιέργειας επιτρέπει τον πλήρη έλεγχο συνθηκών ανάπτυξης όπως παροχή διοξειδίου του άνθρακα, νερού, θερμοκρασίας, έντασης φωτός, επίπεδα pH, αερισμού και πυκνότητας καλλιέργειας, συγκριτικά με τις ανοιχτού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται και μεγαλύτερη απόδοση σε βιομάζα ανά μονάδα επιφάνειας. Συνεπώς, τα κλειστά συστήματα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υψηλής ποιότητας σπιρουλίνας αλλά και ευαίσθητων στελεχών μικροφυκών που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε ανοιχτά συστήματα εξαιτίας αυξημένου κινδύνου επιμόλυνσης από άλλα στελέχη και μικροοργανισμούς, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στις κλειστές καλλιέργειες. Ωστόσο, οι φωτοβιοαντιδραστήρες μειονεκτούν έναντι των ανοιχτών δεξαμενών ως προς το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας το οποίο είναι αρκετά υψηλότερο, καθώς εκτός από το σύστημα ανάδευσης διαθέτουν σύστημα φωτισμού, εμπλουτισμού με CO₂, σύστημα απομάκρυνσης και διαχωρισμού αερίων, το σύστημα θέρμανσης/ψύξης και θρέψης. Η σωστή λειτουργία του συστήματος απομάκρυνσης αερίων, και κυρίως του οξυγόνου που παράγεται από τη φωτοσύνθεση, είναι μια βασική παράμετρος για την εξέλιξη της καλλιέργειας διότι η συσσώρευση του πάνω από ένα βαθμό προκαλεί τοξικότητα στα μικροφύκη (Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2021).

Υπάρχουν διάφορες μορφές φωτοβιοαντιδραστήρων, κατασκευασμένοι κυρίως από πλαστικό ή γυαλί, όπως επίπεδοι, κατακόρυφοι ή κεκλιμένοι, κυλινδρικοί με επιμήκης αγωγούς ή ελικοειδούς μορφής (**Εικόνα 1.5**). Η πιο απλή μορφή φωτοβιοαντιδραστήρα αποτελεί αυτή των σάκων πολυαιθυλενίου και παρουσιάζει το χαμηλότερο κόστος εγκατάστασης. Ωστόσο κάθε σάκος έχει περιορισμένη διάρκεια χρήσης λόγω του υλικού κατασκευής και πρέπει να αντικαθίσταται. (Molina *et al.*, 2001; Vree *et al.*, 2015; Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2021).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι φωτοβιοαντιδραστήρες για παραγωγή σπιρουλίνας σε μεγάλη κλίμακα είναι οι σωληνωτοί καθώς παρουσιάζουν τα εξής πλεονεκτήματα: 1) μεγάλη επιφάνεια φωτισμού 2) υψηλή παραγωγικότητα βιομάζας 3) σχετικά οικονομικό (Acien *et al.*, 2017; Soni *et al.*, 2017).



Εικόνα 1.5: Διάφοροι τύποι κλειστών συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) Φωτοβιοαντιδραστήρες κεκλιμένης στήλης, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) Πλαστικοί σάκοι πολυαιθυλενίου και (4) σωληνωτοί φωτοβιοαντιδραστήρες (Προσαρμοσμένο από Soni *et al.*, 2017).

1.4.1.2. Συλλογή και επεξεργασία σπιρουλίνας

Εκτός από το είδος καλλιέργειας, δύο παράγοντες κλειδί για την επιτυχημένη παραγωγή υψηλής ποιότητας βιομάζας αποτελούν ο τρόπος συλλογής και επεξεργασίας της σπιρουλίνας. Η συλλογή πραγματοποιείται συνήθως τις πρωινές ώρες, καθώς τα ποσοστά πρωτεΐνης της σπιρουλίνας είναι υψηλότερα το πρωί, και αποτελείται από τα εξής δύο στάδια: 1) αρχική διήθηση για να ληφθεί η βιομάζα με 10% περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία και 50% υγρασία (υπολειμματικό μέσο καλλιέργειας) και 2) περαιτέρω επεξεργασία για επιπλέον μείωση της υγρασίας και παραλαβή βιομάζας με 20% ξηρή ουσία. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται είναι το φιλτράρισμα, η επίπλευση (1^ο στάδιο), κατακρήμιση (1^ο στάδιο), φυγοκέντρωση, ηλεκτρολυτική και υπερηχητική δόνηση, με πιο συχνή τη φυγοκέντρωση, κυρίως λόγω

ευκολίας στη χρήση και υψηλής αποτελεσματικότητας συλλογής (πάνω από 90%) (Dassey & Theegala, 2013; Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2021).

Το παραγόμενο προϊόν έχει σύσταση όμοια με πάστα και παρά το γεγονός ότι μπορεί να καταναλωθεί και στη φρέσκια μορφή της (εντός 6 ωρών από τη συλλογή), στο εμπόριο διατίθεται σε μορφή νιφάδων, σκόνης, ταμπλέτας ή κάψουλας για να είναι πιο αποδεκτό από τον καταναλωτή και να έχει μεγαλύτερη διατηρησιμότητα (πάνω από ένα έτος) (Soni *et al.*, 2017). Συνεπώς, για να αποκτήσει την τελική της μορφή η στραγγισμένη πάστα απλώνεται, πλένεται τριπλά με πόσιμο νερό για να απομακρυνθούν τα άλατα του μέσου καλλιέργειας και έπειτα ξηραίνεται με διάφορες μεθόδους όπως έκθεση στον ήλιο, λυοφιλοποίηση, ξήρανση με ψεκασμό (spray-drying), και σε ξηραντήρες τυμπάνου (Soni *et al.*, 2017). Το στάδιο της ξήρανσης έχει μεγάλη οικονομική σημασία καθώς αποτελεί το 20-30% του κόστους παραγωγής (Habib *et al.* 2008). Η ξήρανση με έκθεση στον ήλιο αποτελεί την πιο απλή και οικονομική μέθοδο ξήρανσης, ωστόσο αυξάνεται σημαντικά ο κίνδυνος επιμόλυνσης από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες ενώ ταυτόχρονα η μεγάλη διάρκεια έκθεσης στον ήλιο καταστρέφει τη χλωροφύλλη. Η ξήρανση της σπιρουλίνας σε ξηραντήρες τυμπάνου προκαλεί μείωση κατά 30% του απαραίτητου αμινοξέος μεθειονίνη καθώς και της προβιταμίνης Α κατά 1/3 (Falquet, 1988). Αρκετά αποτελεσματικές μέθοδοι ξήρανσης, που βρίσκουν εφαρμογή κυρίως σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή σπιρουλίνας λόγω αυξημένου κόστους, είναι η ξήρανση με λυοφιλοποίηση και με ψεκασμό (Soni *et al.*, 2017; Lafarga *et al.*, 2021). Η συνολική διάρκεια ξήρανσης πρέπει να είναι 2-7 ώρες με τη θερμοκρασία να μην υπερβαίνει τους 68 °C, ενώ για την καλύτερη διατήρηση κατά την αποθήκευση η υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνά το 3-4% (Soni *et al.*, 2017).

Το αποτέλεσμα της ξήρανσης είναι νιφάδες σπιρουλίνας που αλέθονται σε λεπτό μύλο υψηλής κρούσης για 6-10 ώρες μέχρι το μέγεθος των κόκκων της σκόνης να φτάσει 200-800 nm. Έτσι, παράγεται η σκόνη σπιρουλίνας η οποία μπορεί να συμπιεστεί σε μορφή δισκίων ή να εισαχθεί σε κάψουλα και να φέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: 1) μεγαλύτερη διάρκεια ζωής 2) ευκολία κατανάλωσης 3) υψηλή σταθερότητα στο νερό. Οι δύο πιο κοινές μορφές σπιρουλίνας που διατίθενται στο εμπόριο είναι η σκόνη και τα δισκία και αποτελεί ένα πλήρες τρόφιμο καθώς και συστατικό πολλών τονωτικών τροφίμων και ποτών χάρη της εξαιρετικής του σύστασης (Ogbona *et al.*, 2007; Soni *et al.*, 2017).

1.4.1.3. Χημική Σύσταση Σπιρουλίνας

Όπως προαναφέρθηκε η σπιρουλίνα διαθέτει πλούσια χημική σύσταση αποτελούμενη από όλα τα απαραίτητα μακροθρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπαρά, φυτικές ίνες, τα οποία συνιστούν ένα ολοκληρωμένο τρόφιμο. Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά πράσινα

μικροφύκη (π.χ. Chlorella), η σπιρουλίνα πέπτεται και αφομοιώνεται πιο εύκολα από τον οργανισμό λόγω απουσίας κυτταρίνης στο κυτταρικό της τοίχωμα (Habib *et al.*, 2008). Σύμφωνα με τον Sasson (1997), ύστερα από 18 ώρες, περισσότερο από το 85% της πρωτεΐνης του φύκου αφομοιώνεται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, η περιεκτικότητα της σπιρουλίνας σε πληθώρα μικροθρεπτικών συστατικών όπως μέταλλα, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες προσαυξάνει τη διατροφική της αξία και τα οφέλη από την κατανάλωσή της. Στους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση ανήκουν το στέλεχος του μικροφύκου, οι συνθήκες και ο τρόπος καλλιέργειας και συγκομιδής καθώς και ο βαθμός επεξεργασίας. Στον **Πίνακα 1.2** παρουσιάζεται αναλυτικά η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά ανά 100 g σκόνης σπιρουλίνας.

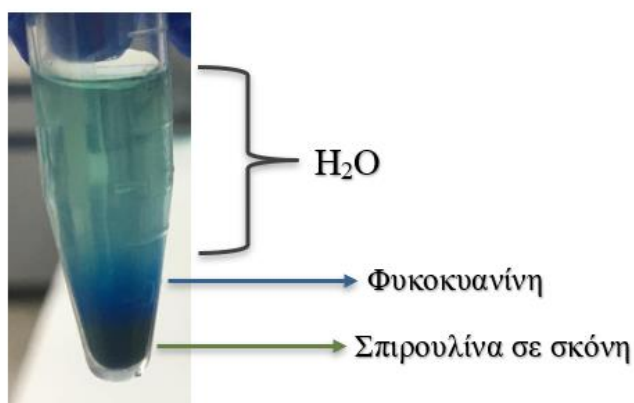
Πίνακας 1.2: Θρεπτικά συστατικά σκόνης σπιρουλίνας (ανά 100 g) (Προσαρμοσμένο από Κουτελιδάκης, 2015²; Lafarga *et al.*, 2020).

| Μακροθρεπτικά συστατικά (g) | | Μέταλλα/Ιχνοστοιχεία | |
|-----------------------------|------|-------------------------|----------|
| Πρωτεΐνη | 62,9 | Ασβέστιο (Ca) (mg) | 1.023,30 |
| Ολικά Λιπαρά | 3,8 | Σίδηρος (Fe) (mg) | 28,5 |
| Πολυακόρεστα | 1,03 | Φώσφορος (P) (mg) | 118 |
| Μονοακόρεστα | 2,4 | Ιώδιο (I) (μg) | 22 |
| Υδατάνθρακες | 8,4 | Μαγνήσιο (Mg) (mg) | 195 |
| Σάκχαρα | <0,5 | Ψευδάργυρος (Zn) (mg) | 2 |
| Εδώδιμες Ίνες | 6,9 | Σελήνιο (Se) (μg) | 7,2 |
| Αμινοξέα (g) | | Χαλκός (Cu) (μg) | 6,1 |
| Ισολευκίνη | 3,21 | Μαγγάνιο (Mn) (mg) | 1,9 |
| Λευκίνη | 4,95 | Χρώμιο (Cr) (μg) | 110 |
| Λυσίνη | 3,02 | Κάλιο (K) (g) | 1,4 |
| Μεθειονίνη | 1,15 | Βάριο (Ba) (μg) | 1,119 |
| Φαινυλαλανίνη | 2,77 | Κοβάλτιο (Co) (μg) | 35 |
| Θρεονίνη | 2,97 | Νάτριο (Na) (g) | 1 |
| Τρυπτοφάνη | 0,93 | Λιπαρά οξέα (mg) | |
| Βαλίνη | 3,51 | γ-Λινολενικό (C18:3) | 1.960,40 |
| Ιστιδίνη | 1,08 | α-Λινολενικό (C18:3) | 311,2 |
| Αλανίνη | 4,51 | Λινελαϊκό (C18:2) | 138,7 |
| Αργινίνη | 4,15 | Παλμιτικό (C16:0) | 735,3 |
| Ασπαρτικό οξύ | 5,79 | Ελαϊκό (C18:1) | 157,3 |
| Κυστεΐνη | 0,66 | Μυριστικό (C14:0) | 85,9 |
| Γλουταμινικό οξύ | 8,39 | Καπρινικό (C10:0) | 61,2 |
| Γλυκίνη | 3,09 | Λαουρικό (C12:0) | 59,3 |
| Προλίνη | 2,38 | Παλμιτελαϊκό (C16:1) | 48,6 |
| Σερίνη | 2,99 | Στεατικό (C18:0) | 48,3 |

I. Πρωτεΐνες- Αμινοξέα

Η περιεκτικότητα της σπιρουλίνας σε πρωτεΐνη κυμαίνεται μεταξύ 50% και 70% της ξηρής ουσίας της, με αποτέλεσμα να ξεπερνά σημαντικά τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνούχων φυτικών και ζωικών τροφίμων όπως αλεύρι σόγιας (35%), βόδινο κρέας (15-25%), σκόνη γάλακτος (35%) και αυγά (σκόνη) (47%) (Ravindran *et al.*, 2016; Soni *et al.*, 2017). Το ποσοστό αυτό μεταβάλλεται κατά 10-15% ανάλογα την ώρα συγκομιδής του φύκους που σχετίζεται κυρίως με την έκθεση στο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της ημέρας. Φαίνεται πως οι υψηλότερες τιμές επιτυγχάνονται τις πρώτες πρωινές ώρες (Falquet, 1988).

Από ποιοτικής άποψης, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της σπιρουλίνας είναι βιολογικά πλήρες καθώς περιέχει και τα οκτώ απαραίτητα αμινοξέα (ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, βαλίνη), τα οποία αποτελούν το 47% του βάρους της πρωτεΐνης, αλλά και δέκα από τα δώδεκα μη απαραίτητα αμινοξέα (αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγινικό οξύ, κυστίνη, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, προλίνη, σερίνη, τυροσίνη) (Πίνακας 1.2). Από τα παραπάνω αμινοξέα, σε χαμηλότερη συγκέντρωση βρίσκονται η μεθειονίνη και η κυστεΐνη. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και το FAO (Food and Agricultural Organization) η σπιρουλίνα αποτελεί την πιο πλούσια και «ιδανική» πηγή πρωτεΐνης (Falquet, 1988; Habib *et al.*, 2008; Lafarga *et al.*, 2020). Βασική πρωτεΐνη της σπιρουλίνας είναι η c-φυκοκυανίνη, μια φυσική υδατοδιαλυτή χρωστική που είναι υπεύθυνη για το κυανό χρώμα του μικροφύκους (Εικόνα 1.6). Βρίσκεται συνδεδεμένη με το χρωμοφόρο μόριο φυκοκυανομπιλίνη και αποτελεί το 15-25% της ξηράς μάζας του φύκους. Μαζί με την αλλοφυκοκυανίνη και την φυκοερυθρίνη συνιστούν τις φυκομπιλοπρωτεΐνες, ένα σημαντικό κλάσμα πρωτεϊνών της σπιρουλίνας, καθώς αντιπροσωπεύει το 60% του συνόλου των πρωτεϊνών της. Η φυκοκυανίνη δεν έχει εντοπισθεί σε άλλο τρόφιμο και έχει τεκμηριωθεί ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (Romay *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005; Martínez-Palma *et al.*, 2015; Saranraj & Sivasakthi, 2015; Lafarga *et al.*, 2020).



Εικόνα 1.6: Διαχωρισμός της κυανής χρωστικής φυκοκυανίνης από ίζημα σπιρουλίνας σε νερό.

II. Λιπίδια

Η σπιρουλίνα περιέχει λιπίδια σε ποσοστό 5-8%, τα περισσότερα από τα οποία είναι ακόρεστα. Αποτελεί σημαντική πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty Acids-PUFAs) που είναι δυσεύρετα στα περισσότερα συμβατικά τρόφιμα και τα οποία είναι απαραίτητα για μια ισορροπημένη διατροφή και για την επαγωγή της υγείας. Συγκεκριμένα το 30-40% του συνόλου των λιπιδίων της σπιρουλίνας (κυρίως για *S. Platensis*) αποτελείται από γ-λινολενικό οξύ (GLA) που ανήκει στην οικογένεια των ωμέγα-6 λιπαρών οξέων, και ακολουθούν το α-λινολενικό οξύ (ωμέγα-3), το λινελαϊκό (ωμέγα-6) και το παλμιτικό οξύ που περιέχονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Επίσης, άλλα λιπαρά οξέα που περιέχονται είναι το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA) και εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA). Στα παραπάνω λιπαρά οξέα αποδίδονται πολλές από τις ιδιότητες της σπιρουλίνας όπως ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης (GLA), αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδης δράσεις (α-λινολενικό οξύ και λινελαϊκό) (Falquet 1988; Habib *et al.*, 2008; Lafarga *et al.*, 2020). Ειδικότερα, το γ-λινολενικό οξύ συντελεί στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της διέγερσης της φαγοκύτωσης, της επίδρασης στη παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών, την αποτροπή της υπερλειτουργίας των μακροφάγων καθώς και της παραγωγής αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα και τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων (Κουτελιδάκης, 2015²).

III. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες συνιστούν το 15-25% του ξηρού βάρους της σπιρουλίνας και περιλαμβάνουν εύκολα αφομοιώσιμους πολυσακχαρίτες αποτελούμενους κυρίως από πολυμερή της γλυκοζαμίνης, ραμνοζαμίνης ή γλυκογόνου και σε μικρότερες ποσότητες από απλά σάκχαρα γλυκόζης, φρουκτόζης και σουκρόζης. Η γλυκοζαμίνη σε συνδυασμό με μουραμικό οξύ και πεπτιδία αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος της σπιρουλίνας το οποίο είναι

εύθραυστο (λόγω απουσίας κυτταρίνης) και καθιστά το περιεχόμενο των κυττάρων εύκολα προσβάσιμο στα πεπτικά ένζυμα. Από διατροφικής άποψης, ένας υδατάνθρακας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον που βρίσκεται σε επαρκείς ποσότητες (350-850 mg/kg ξηρής ουσίας), είναι η φωσφορική μεσοϊνσιτόλη. Ο υδατάνθρακας αυτός αποτελεί σημαντική πηγή οργανικού φωσφόρου και ινσιτόλης που συμμετέχει στο σχηματισμό νέων νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο (Challem *et al.*, 1981; Falquet, 1988). Επιπλέον, ο πολυσακχαρίτης σπιρουλάνη αποτρέπει τη διείσδυση των ιών στο κύτταρο ξενιστή συμβάλλοντας στην αντική δράση της σπιρουλίνας (Barron *et al.*, 2008).

IV. Βιταμίνες

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 1.3** κύριες βιταμίνες που ανευρίσκονται φυσικά στη σπιρουλίνα είναι η προβιταμίνη A (β-καροτένιο), βιταμίνες του συμπλέγματος B και βιταμίνη E. Το β-καροτένιο αποτελεί πρόδρομη ένωση της βιταμίνης A στον οργανισμό των θηλαστικών και στη σπιρουλίνα βρίσκεται σε επαρκής συγκεντρώσεις, περίπου 30 φορές υψηλότερες από ότι στο καρότο. Ένα με δύο γραμμάρια σπιρουλίνας είναι αρκετά για την κάλυψη των ημερήσιων αναγκών ενός ατόμου σε βιταμίνη A (Soni *et al.* 2017). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Habib *et al.* (2008) και Gershwin & Belay (2008), το β-καροτένιο δρα ως αντιοξειδωτικό συστατικό και η πρόσληψη 6 mg ημερησίως περιορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Από τις βιταμίνες του συμπλέγματος B ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή περιεκτικότητα της σπιρουλίνας σε βιταμίνη B12, καθώς αυτή δύσκολα ανευρίσκεται σε φυτικά τρόφιμα. Ειδικότερα η σπιρουλίνα ξεπερνά κατά 4 φορές τη περιεκτικότητα ωμού συκωτιού σε βιταμίνη B12 που θεωρείται σημαντική πηγή (Falquet, 1988; Khan *et al.*, 2005; Soni *et al.* 2017) . Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχει μια αντιπαράθεση σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα της συγκεκριμένης βιταμίνης στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς σύμφωνα με την έρευνα των Watanabe *et al.* (2002) που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια βρέθηκε πως οι ταμπλέτες σπιρουλίνας περιέχουν κυρίως ψευδοβιταμίνη B12 που είναι μια ανενεργή μορφή στα θηλαστικά με συνέπεια να είναι ακατάλληλες πηγές βιταμίνης B12 ιδιαίτερα για χορτοφάγους. Ωστόσο, οι Edelman *et al.* (2019) αξιολόγησαν επίσης την περιεκτικότητα της βιταμίνης B12 σε συμπληρώματα διαφόρων μικροφυκών και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της βιταμίνης στις εμπορικές σκόνες σπιρουλίνας βρίσκονταν στην ανενεργή μορφή (ψευδοβιταμίνη B12), οι ημερήσιες ανάγκες θα μπορούσαν ακόμα να καλυφθούν με την κατανάλωση 4 g αποξηραμένης βιομάζας.

Τέλος, η σπιρουλίνα περιέχει την αντιοξειδωτική βιταμίνη E σε ποσότητες συγκρίσιμες με το φύτρο σιταριού (Falquet, 1988; Soni *et al.* 2017).

Πίνακας 1.3: Περιεκτικότητα σκόνης σπιρουλίνας σε βιταμίνες (ανά 100 g) (Προσαρμοσμένο από Κουτελιδάκης, 2015²; Lafarga *et al.*, 2020).

| Βιταμίνες | |
|------------------------------------|------|
| Προβιταμίνη A (Καροτένιο) (mg) | 60,1 |
| Βιταμίνη B1 (Θειαμίνη) (mg) | 5,3 |
| Βιταμίνη B2 (Ριβοφλαβίνη) (mg) | 2,44 |
| Βιταμίνη B3 (Νιασίνη) (mg) | 10,8 |
| Βιταμίνη B5 (Παντοθενικό οξύ) (mg) | 1,07 |
| Βιταμίνη B6 (Πυριδοξίνη) (μg) | 549 |
| Βιταμίνη B7 (Βιοτίνη) (μg) | 44 |
| Βιταμίνη B9 (Φυλλικό οξύ) (μg) | 827 |
| Βιταμίνη B12 (Κοβαλαμίνη) (μg) | 182 |
| Βιταμίνη E (Τοκοφερόλη) (mg) | 7,78 |
| Ινοσιτόλη (mg) | 8,24 |

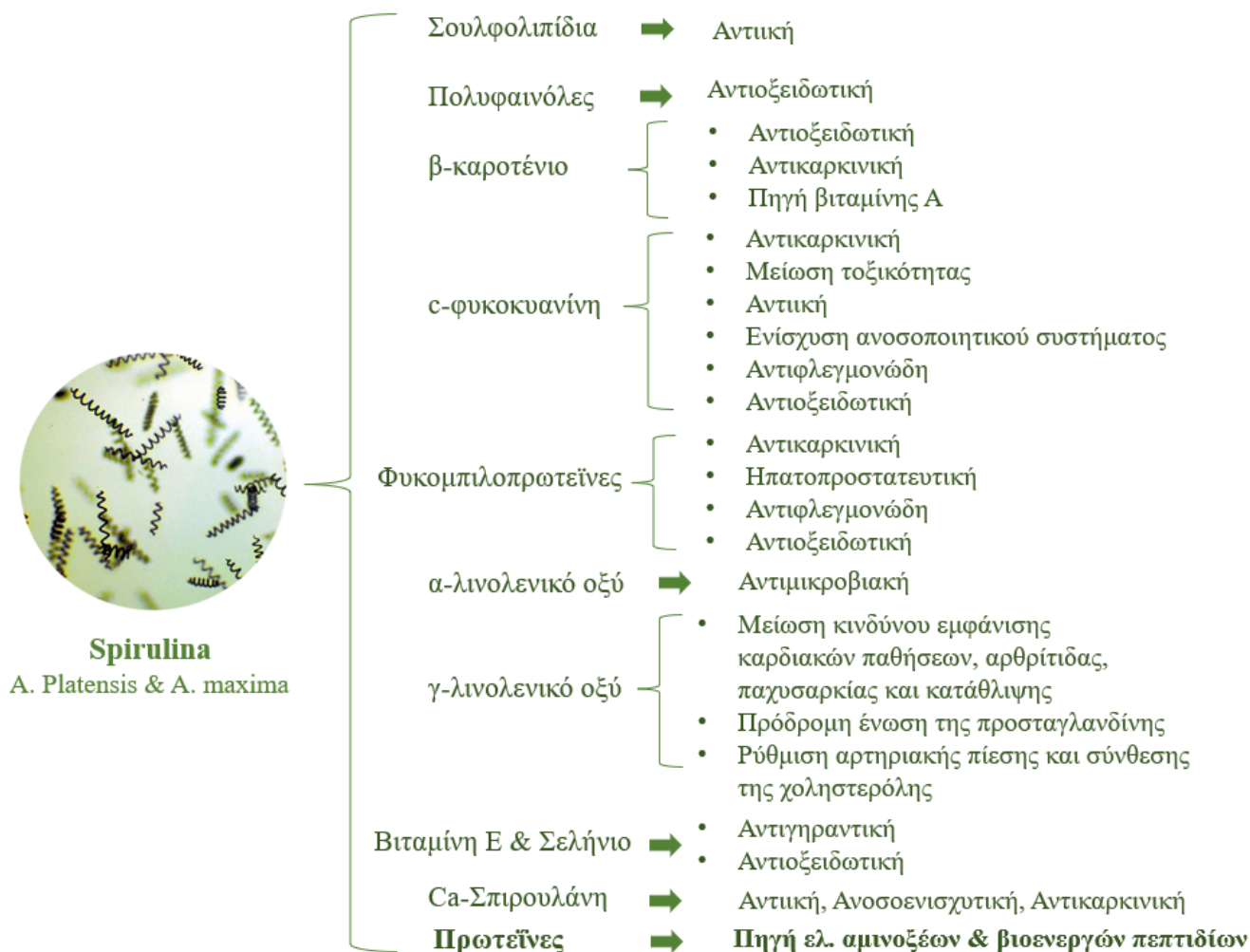
V. Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία

Τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία που εμπεριέχονται στη σπιρουλίνα εξισορροπούν τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών του οργανισμού (Khan *et al.*, 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιεκτικότητα σε σίδηρο (Fe), ασβέστιο (Ca), και φώσφορο (P) καθώς ο σίδηρος βρίσκεται στη σπιρουλίνα σε ποσότητες 20 φορές μεγαλύτερες με τα δημητριακά ολικής άλεσης που θεωρούνται πλούσιες πηγές σιδήρου ενώ οι συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου μπορούν να συγκριθούν με αυτές του γάλακτος. Επιπλέον, η σπιρουλίνα πλεονεκτεί ως προς την περιεκτικότητα σιδήρου καθώς τέτοιες συγκεντρώσεις παρατηρούνται κυρίως σε προϊόντα ζωικής προέλευσης με συνέπεια να αποτελεί κατάλληλη πηγή τέτοιων μετάλλων ακόμα και για χορτοφαγικές δίαιτες (Falquet, 1988; Soni *et al.*, 2017; Kougia *et al.*, 2023). Τέλος, έχει αναφερθεί πως η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου της σπιρουλίνας είναι υψηλότερη από εκείνη του βόειου κρέατος καθιστώντας το φύκος ένα πιθανό εργαλείο για την καταπολέμηση της σιδηροπενικής αναιμίας (Kougia *et al.*, 2023).

1.4.1.4. Η Σπιρουλίνα ως Λειτουργικό Τρόφιμο

Μία κατηγορία λειτουργικών τροφίμων στα οποία έχουν επικεντρωθεί αρκετές επιστημονικές μελέτες τα τελευταία χρόνια, είναι τρόφιμα φυσικής ή ηπίως επεξεργασμένης προέλευσης τα οποία αφενός εμφανίζουν υψηλή διατροφική αξία λόγω αυξημένης συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών και αφετέρου μεγάλη βιολογική αξία, λόγω της ικανοποιητικής βιοδιαθεσιμότητας και βιοδραστικότητας εντός του οργανισμού μιας ποικιλίας βιοενεργών συστατικών που περιέχουν. Τα τρόφιμα αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως «υπερτρόφιμα» (superfoods) (Underwood, 2005; Wolfe, 2009; Κουτελιδάκης, 2015²).

Η σπιρουλίνα έχει αναγνωριστεί ως πλούσια πηγή βιοδιαθέσιμων θρεπτικών και βιοενεργών συστατικών όπως β-καροτένιο, φυκομπιλοπρωτεΐνες, c-φυκοκυανίνη, πολυσακχαρίτες, σπιρουλάνη, α-λινολενικό οξύ, γ-λινολενικό οξύ, βιταμίνες (E,B), μέταλλα και ιχνοστοιχεία, πολυφαινόλες, απαραίτητα αμινοξέα κτλ., καθένα από τα οποία επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες εντός του οργανισμού προσδίδοντάς της πολυάριθμες θεραπευτικές ιδιότητες όπως παρουσιάζονται και στο **Σχήμα 1.2**. Συγκεκριμένα, επιστημονικές έρευνες *in vivo* (προκλινικές και κλινικές κυρίως σε ζώα) και *in vitro* έχουν επιβεβαιώσει ιδιότητες όπως αντιυπερτασικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδης, αντιακές (HIV, γρίπη και άλλοι ιοί), αντιαλλεργικές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, ηπατοπροστατευτικές, υποχοληστερολαιμικές, υπολιπιδιμικές, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω αύξησης της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μακροφάγων και ρύθμισης της παραγωγής αντισωμάτων και κυτοκινών, ενίσχυση της εντερικής μικροχλωρίδας (κυρίως *Lactobacillus* και *Bifidus*), μείωση του σωματικού βάρους, βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας καθώς και μείωση της νεφροτοξικότητας (Belay *et al.*, 1993; Belay, 2002; Khan *et al.*, 2005; Barron *et al.*, 2008; Kulshreshtha *et al.*, 2008; Gershwin & Belay, 2008; Κουτελιδάκης, 2015²; Ovando *et al.*, 2018; Anekthanakul *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Συνεπώς, η πλούσια σύσταση της σπιρουλίνας σε θρεπτικά και βιοενεργά συστατικά, η αυτόνομη δράση αυτών, καθώς και η αρμονική τους συνέργεια έχουν οδηγήσει στον χαρακτηρισμό της ως ένα από τα καλύτερα υπερτρόφιμα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) με πολλές προοπτικές στη χρήση αυτής και των συστατικών της για την παραγωγή και ανάπτυξη καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων εφόσον αυτά είναι σταθερά στις διάφορες συνθήκες επεξεργασίας, βιοδιαθέσιμα στο σώμα και αφού ληφθεί έγκριση από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority- EFSA) (Hayashi *et al.*, 1996; Mani *et al.*, 2000; Underwood, 2005; Khan *et al.*, 2005; Kulshreshtha *et al.*, 2008; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2011; Al-Dhabi, 2013; Pereira *et al.*, 2019; Lafarga, T., 2019; Lafarga *et al.*, 2020). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως αρκετές από τις βιολειτουργικές ιδιότητες της σπιρουλίνας έχουν αποδοθεί σε μια κατηγορία βιοενεργών συστατικών γνωστά ως βιοενεργά πεπτίδια.



Σχήμα 1.2: Τα βασικότερα βιολειτουργικά συστατικά της σπιρουλίνας και οι επιδράσεις τους στην υγεία (Προσαρμοσμένο από Khan *et al.*, 2005; Belay, 2008; Gershwin & Belay, 2008; Kulshreshtha *et al.*, 2008; Κουτελιδάκης, 2015²; Ovando *et al.*, 2018).

1.4.1.5. Τα Βιοενεργά Πεπτίδια της Σπιρουλίνας

Οι υδρόβιοι οργανισμοί εξαιτίας των ιδιαίτερων συνθηκών ανάπτυξης παρουσιάζουν διαφοροποιημένη σύνθεση και αλληλουχία αμινοξέων συγκριτικά με τις πρωτεΐνες των επίγειων οργανισμών (Ovando *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2019). Τα μικροφύκη και ειδικότερα η σπιρουλίνα που διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (50-70%), έχει προταθεί ως σημαντική πηγή βιοενεργών πεπτιδίων, που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, επιφέροντας ωφέλιμες ιδιότητες για την υγεία (Suetsuna & Chen, 2001; Belay, 2002; Becker, 2007; Lu *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014; Lisboa *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017; Ovando *et al.*, 2018; Anekthanakul *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Ειδικότερα, από τη βιομάζα της σπιρουλίνας τα βιοενεργά πεπτίδια μπορούν να ληφθούν από μία σειρά διεργασιών συμπεριλαμβανομένου

της κυτταρικής λύσης, εκχύλισης πρωτεϊνών, ενζυμικής υδρόλυσης (γαστρεντερικής πέψης), και κλασματοποίησης (Ovando *et al.*, 2018; Sedighi *et al.*, 2019).

Στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 1.4**) παρουσιάζονται αναλυτικά οι αλληλουχίες των βιοενεργών πεπτιδίων που απομονώθηκαν από διάφορα στελέχη σπιρουλίνας μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με πρωτεολυτικά ένζυμα (τρυψίνη, χυμοτρυψίνη, πεψίνη, κτλ.) και άλλες μεθόδους, καθώς και οι βιολειτουργικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Lafarga *et al.* (2021) η βιομηχανική παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων από σπιρουλίνα δεν έχει επιτευχθεί κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής και του περιορισμένου αριθμού επιστημονικών αναφορών που επικυρώνουν την βιολογική τους δραστηριότητα *in vivo*.

Πίνακας 1.4: Βιοενεργά πεπτιδία σπιρουλίνας και οι βιολειτουργικές τους ιδιότητες (*in vitro*) (Προσαρμοσμένο από Sedighi *et al.*, 2018; Ovando *et al.*, 2018 και Lafarga *et al.*, 2021).

| Αλληλουχία πεπτιδίων | Πρωτεολυτικά ένζυμα/ Μέθοδος απομόνωσης | Στέλεχος προέλευσης | Βιολειτουργικές ιδιότητες | Αναφορές |
|--|--|--------------------------------|--|--|
| LDAVNR & MMLDF | Τρυψίνη, α-χυμοτρυψίνη και πεψίνη | <i>Spirulina maxima</i> | Αντιφλεγμονώδη | Vo <i>et al.</i> (2013) ¹ |
| | | | Αντιαλλεργική | Vo <i>et al.</i> (2014) |
| | | | Αντιαθηροσκληρωτική | Vo <i>et al.</i> (2013) ² |
| | | | Ανοσορυθμιστική (1.Αναστολή απελευθέρωσης ισταμίνης 2.Παραγωγή IL-8 από ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926) | Vo <i>et al.</i> (2013) ¹ |
| IAG | Πεψίνη | <i>Spirulina platensis</i> | Αντιυπερτασική (ACE-I παρεμπόδιση) | Suetsuna &Chen (2001) |
| FAL | | | | |
| AGL | | | | |
| IAPG | | | | |
| VAF | | | | |
| IQP* | Αλκαλάση | | | Lu <i>et al.</i> (2010, 2011) Suetsuna & Chen (2001) |
| VEP | Παπαΐνη | | | Lu <i>et al.</i> (2011) ^{2,3} |
| IQP & VEP* | | | | Pan <i>et al.</i> (2015) He <i>et al.</i> (2018) Zheng <i>et al.</i> (2017) |
| Νανοπολυπεπτίδιο Y2-C (δεν έχει αναφερθεί αλληλουχία) | Τρυψίνη | | Δράση κατά του σχηματισμού όγκων | Korhonen <i>et al.</i> (1998) |
| TDPLACL | Αλκαλάση | | Δέσμευση σιδήρου (Fe) | Kim <i>et al.</i> (2014) |
| LRSELAAWSR | Απομόνωση πεπτιδίου με υπερήχους | | Αντιδιαβητική | Hu <i>et al.</i> (2019) |
| EYFDALA | Πεψίνη | | Αντιοξειδωτική | Zeng <i>et al.</i> (2020) |

| | | | | |
|--------------------|---|--|---|-----------------------------------|
| KLVDASHRLATGDVAVRA | Αλκαλική πρωτεάση ακολουθούμενη από παπαΐνη | | Αντιμικροβιακή κατά των <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> | Sun <i>et al.</i> (2016) |
| IRDLDY | Θερμολυσίνη | | Αντιυπερτασική (ACE-I παρεμπόδιση) | Anekthanakul <i>et al.</i> (2019) |
| HVLSRAPR | Τρυψίνη, α-χυμοτρυψίνη και πεψίνη | | Αντικαρκινική (1.Αναστολή πολλαπλασιασμού τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7, HepG-2 και SGC-7901 2.Ισχυρή παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού της καρκινικής σειράς HT-29) | Wang & Zhang (2017) |

**in vivo* εντοπισμένες βιολειτουργικές ιδιότητες.

1.4.2. Χλωρέλλα (*Chlorella*)

Η χλωρέλλα αποτελεί μονοκύτταρο ευκαρυωτικό μικροφύκος του γλυκού νερού που ανήκει στα Χλωρόφυτα και έχει την ικανότητα να φωτοσυνθέτει. Το όνομά της προκύπτει από την ελληνική λέξη «χλωρός» και την λατινική κατάληξη *-ella* που υποδηλώνει το μικροσκοπικό της μέγεθος το οποίο κυμαίνεται από 2 έως 10 μm σε διάμετρο. Έχει σφαιρικό ή ελλειψοειδές σχήμα (Εικόνα 1.7) και τα δομικά της συστατικά είναι όμοια με των φυτικών κυττάρων (χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια, πυρήνας, σύμπλεγμα Golgi). Ορισμένα είδη χλωρέλλας (*Chlorella vulgaris*) διαθέτουν διπλά κυτταρικά τοιχώματα τα οποία περιέχουν αδρανή βιολογικά πολυμερή, τις σποροπολλενίνες οι οποίες δυσκολεύουν την πέψη της από πεπτικά ένζυμα και δεσμεύουν τα βαρέα μέταλλα (Safi *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2020).

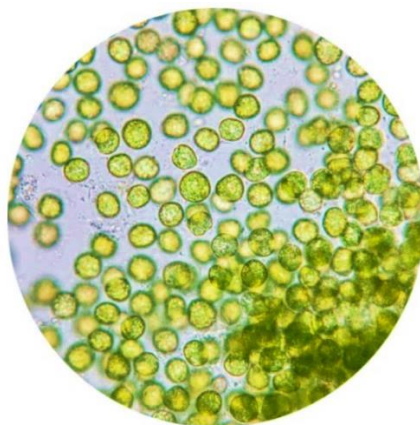
Η χλωρέλλα αναπαράγεται αγενώς εντός 24 ωρών με αυτοσπóρια όπως τα περισσότερα μικροάλγη. Συγκεκριμένα, σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, εντός ενός αρχικού κυττάρου χλωρέλλας σχηματίζονται 4 θυγατρικά τα οποία μετά την ωρίμανσή τους απελευθερώνονται από το αρχικό ύστερα από ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος του τελευταίου. Τα υπολείμματα του αρχικού κυττάρου χρησιμοποιούνται ως πηγή θρεπτικών συστατικών για τα νεοσύστατα κύτταρα (Yamamoto *et al.*, 2004; Safi *et al.*, 2014).

Η ύπαρξή της στη γη χρονολογείται στα 2,5 δισεκατομμύρια έτη και πρώτη φορά κίνησε το ενδιαφέρον ως μη συμβατικό τρόφιμο, χάρη στη πρωτεϊνική της σύνθεση (> 55% της ξηρής ουσίας), το 1894 σε έναν Γερμανό επιστήμονα (Kruger). Η πρώτη τεκμηριωμένη απόδειξη των δυνατοτήτων της χλωρέλλας ως συμπλήρωμα διατροφής αποτέλεσε η βελτιωμένη κατάσταση 80 λεπτών ασθενών στη Βενεζουέλα, που κατανάλωναν συμπυκνωμένη σούπα χλωρέλλας υπό την επίβλεψη δύο ερευνητών (Jorgensen & Convit) το 1940 (Rani *et al.*, 2018). Έπειτα, τη δεκαετία του 1950 το Ινστιτούτο Carnegie της Ουάσιγκτον ανέλαβε τη μελέτη και κατάφερε να αναπτύξει το μικροφύκος σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια. Σήμερα, η Ιαπωνία είναι παγκόσμιος ηγέτης στη κατανάλωση χλωρέλλας και τη χρησιμοποιούν κυρίως στη

φαρμακευτική, ακολουθεί η Γερμανία και η Ταϊβάν (Safi *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2020). Γενικότερα, έχουν αναγνωριστεί διάφορα είδη χλωρέλλας όπως *Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella ellipsoidea* με τη *Chlorella vulgaris* να αποτελεί το πιο μελετημένο είδος με τις περισσότερες εφαρμογές τόσο στην ανθρώπινη διατροφή όσο και σε άλλους τομείς (Rani *et al.*, 2018).

Η ανάπτυξη του μικροφύκου και η σύστασή του επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η χημική σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, το pH, η αλατότητα, η θερμοκρασία και το φως (ένταση/διάρκεια) (Sharma *et al.*, 2012). Από διατροφικής άποψης, η χλωρέλλα αποτελείται από 55-60% πρωτεΐνες, 5-40% λιπαρά, 12-55% υδατάνθρακες, μέταλλα (σίδηρο, κάλιο, ασβέστιο, φολικό οξύ κ.α.) ιχνοστοιχεία και βιταμίνες (σύμπλεγμα Β, Ε, C, D, και Κ). Επιπλέον, το προφίλ των αμινοξέων της είναι ιδιαίτερα ευνοϊκό καθώς περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και ικανοποιεί τις ανάγκες της ανθρώπινης διατροφής σύμφωνα με τους FAO/WHO (Rodriguez-Garcia & Guil-Guerrero 2008; Ahmad *et al.*, 2020).

Εκτός από τη θρεπτική της σύσταση έχουν τεκμηριωθεί και άλλες ιδιότητες της χλωρέλλας όπως ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές, αντικαρκινικές, αντιγηραντικές, αντιοξειδωτικές, προστασία κατά της αιματοποίησης. Αποτέλεσμα αυτού είναι το φύκος να βρίσκει πολλές εφαρμογές ως συστατικό τροφίμων και ζωοτροφών, στη παραγωγή φαρμάκων και καλλυντικών, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για παραγωγή βιοκαυσίμων και ως τροφή για ψάρια σε υδατοκαλλιέργειες. Στην ανθρώπινη διατροφή καταναλώνεται κυρίως ως συμπλήρωμα σε μορφή κάψουλας, σκόνης ή ταμπλέτας και παρά τη σύστασή της που ανταγωνίζεται άλλα συμβατικά τρόφιμα δεν αποτελεί ένα από αυτά και ανήκει στα τροφοφάρμακα (nutraceuticals) (Safi *et al.*, 2014), δηλαδή διατροφικά συμπληρώματα που μεταφέρουν μια συμπυκνωμένη μορφή ενός βιοδραστικού συστατικού τροφίμου (εμπεριεχομένο σε ένα μέσο που δεν αποτελεί τρόφιμο) που λαμβάνονται σε συγκεκριμένες δόσεις έχοντας ως στόχο τη προαγωγή της ανθρώπινης υγείας (Zeisel, 1999).



Εικόνα 1.7: Χλωρέλλα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Διαθέσιμο στο: <https://www.teregroup.it/en/chlorella/>).

1.4.2.1. Καλλιέργεια και Παραγωγή Χλωρέλλας

Η ετήσια παραγωγή χλωρέλλας ανέρχεται σε πάνω από 2.000 τόνους ετησίως με κύριες παραγωγικές χώρες τη Ιαπωνία, τη Κίνα και τη Γερμανία (Vigani *et al.*, 2015). Η *Chlorella vulgaris* είναι ιδανική για παραγωγή σε ευρεία κλίμακα, καθώς παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στις αντίξοες συνθήκες και τους διάφορους επιμολυντές. Όπως και η σπιρουλίνα η χλωρέλλα αναπτύσσεται σε υδάτινες καλλιέργειες και ύστερα απομονώνεται και επεξεργάζεται κατάλληλα ώστε να αποκτήσει την εμπορικά διαθέσιμη μορφή της. Έχουν δοκιμαστεί διάφορες τεχνικές για τη βέλτιστη ανάπτυξη και καλλιέργεια της χλωρέλλας ώστε να επιτευχθεί μέγιστη παραγωγικότητα και απόδοση σε θρεπτικά συστατικά με τις κυρίαρχες να είναι η ετερότροφη, η αυτότροφη τεχνική και ο συνδυασμός τους (Safi *et al.*, 2014).

I. Ετερότροφη ανάπτυξη

Η τεχνική αυτή δεν απαιτεί φως και η βιομάζα των μικροφυκών τροφοδοτείται με πηγή οργανικού άνθρακα για την κάλυψη των ενεργειακών της αναγκών. Συνήθως χρησιμοποιείται γλυκόζη, οξικό άλας, γλυκερίνη και γλουταμικό με ανώτατο ρυθμό ανάπτυξης να επιτυγχάνεται με τη χρήση γλυκόζης. Έτσι, τα μικροφύκη αναπτύσσονται σε αναδεδόμενους βιοαντιδραστήρες ή ζυμωτές αποδίδοντας ικανοποιητικά σε βιομάζα και σε θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, ένα βασικό μειονέκτημα του συστήματος αποτελεί το κόστος και η διαθεσιμότητα των σακχάρων καθώς υπάρχει έντονος ανταγωνισμός της πρώτης ύλης για άλλες χρήσεις όπως π.χ. στη βιομηχανία τροφίμων ή για τη παραγωγή βιοκαυσίμων (Safi *et al.*, 2014).

II. Αυτότροφη ανάπτυξη

Ομοίως με τη σπιρουλίνα (**Ενότητα 1.4.1.1.**), η χλωρέλλα μπορεί να αναπτυχθεί αυτότροφα μέσω φωτοσύνθεσης τόσο σε ανοιχτού τύπου καλλιέργειες που είναι οι πιο κοινές και οικονομικές για μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες, όσο και σε κλειστούς φωτοβιοαντιδραστήρες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης (ένταση φωτός, pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση CO₂) για την επίτευξη υψηλότερης κυτταρικής συγκέντρωσης και την παραγωγή κατάλληλων προϊόντων για χρήση στη βιομηχανία καλλυντικών, φαρμάκων και ως τροφοφάρμακα (Safi *et al.*, 2014).

III. Συνδυασμός αυτότροφης και ετερότροφης ανάπτυξης

Η χλωρέλλα είναι ικανή να αναπτύσσεται και με συνδυασμό των δύο παραπάνω τεχνικών, δηλαδή με ταυτόχρονη εκτέλεση φωτοσύνθεσης και την αξιοποίηση των οργανικών υλικών

που της παρέχονται (κυρίως γλυκόζη) (Liang *et al.*, 2009). Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει αυστηρή εξάρτηση του φύκους από το φως ή το οργανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή του. Η τεχνική αυτή ανταγωνίζεται σημαντικά τα αυτότροφα συστήματα και σύμφωνα με τους Yeh & Chang (2012) ο συνδυασμός των δύο συνθηκών αποβαίνει σε αύξηση της ξηράς ουσίας και της σύστασης των μικροφυκών σε λιπίδια. Ένα επιπλέον βασικό πλεονέκτημα του μικτού αυτού συστήματος είναι ο περιορισμός της απώλειας βιομάζας τις σκοτεινές ώρες (νυχτερινή αναπνοή), η εξοικονόμηση ηλεκτρικής ενέργειας καθώς και η μειωμένη ποσότητα των οργανικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται (Safi *et al.*, 2014).

IV. Άλλες τεχνικές ανάπτυξης

Άλλες τεχνικές ανάπτυξης περιλαμβάνουν τη συγκαλλιέργεια της χλωρέλλας με άλλους μικροοργανισμούς όπως το βακτήριο *Azospirillum brasilense* όπου η συνεργιστική τους δράση ευνοεί την ανάπτυξη και των δύο ειδών (de-Bashan *et al.*, 2005). Αρχικά, το βακτήριο αξιοποιεί το οξυγόνο που παράγει η χλωρέλλα με τη φωτοσύνθεση και βιοαποικοδομεί τους ρύπους και τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα του περιβάλλοντός τους. Στη συνέχεια, η χλωρέλλα καταναλώνει το CO₂ που παράγει το βακτήριο κατά την αναπνοή. Κατά συνέπεια, ανάλογα με το στέλεχος της χλωρέλλας, η τεχνική αυτή μπορεί να έχει αντίκτυπο στη παράταση της διάρκειας ζωής των κυττάρων, την ενίσχυση της παραγόμενης βιομάζας, την αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και τη συσσώρευση χρωστικών και λιπιδίων (Safi *et al.*, 2014). Ωστόσο, η συγκαλλιέργεια του φύκους με ορισμένους μικροοργανισμούς όπως το βακτήριο *Phyllobacterium myrcinacearum* μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στη φωτοσύνθεση και να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης ή κυτταρικό θάνατο (Lebsky *et al.*, 2001; Safi *et al.*, 2014).

1.4.2.2. Συλλογή και επεξεργασία χλωρέλλας

Η χλωρέλλα συγκομίζεται και επεξεργάζεται με τεχνικές αντίστοιχες της σπιρουλίνας (**Ενότητα 1.4.1.2.**). Η πιο κοινή μέθοδος συλλογής της *C. vulgaris* είναι η φυγοκέντρηση (5000 rpm για 15 λεπτά), που συνεισφέρει κατά 20-30% στη συνολικά παραγόμενη βιομάζα, εξαιτίας της ταχύτητας της μεθόδου, της αποτελεσματικότητάς της (95% ανάκτηση) και τον μεγάλο όγκο επεξεργασίας που επιτρέπει (Cha *et al.*, 2010). Επιπλέον, η μορφολογία του φύκους δίνει τη δυνατότητα εφαρμογής της φυγοκέντρησης χωρίς παράλληλα να καταστρέφεται η δομή του. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η κροκίδωση, η επίπλευση, το φιλτράρισμα ή ο συνδυασμός τους για μεγαλύτερη ανάκτηση της βιομάζας (Safi *et al.*, 2014).

Η κροκίδωση, δηλαδή η συσσωμάτωση των κυττάρων και ο σχηματισμός σβώλων, επιτυγχάνεται φυσικά στη καλλιέργεια της χλωρέλλας κατά τη στατική και πλωτική φάση ανάπτυξης, κυρίως λόγω εξουδετέρωσης του αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια των

κυττάρων, το οποίο τα απωθεί και δεν επιτρέπει την συνένωσή τους (Vandamme *et al.*, 2012; Safi *et al.*, 2014). Το φαινόμενο αυτό αποκαλείται αυτό-κροκίδωση και οφείλεται στην αύξηση του pH λόγω συσσώρευσης CO₂ στη καλλιέργεια (Vandamme *et al.*, 2012). Είναι οικονομική αλλά χρονοβόρα μέθοδος απομόνωσης των μικροφυκών και συνήθως ενισχύεται με προσθήκη κάποιας βάσης, κυρίως υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή ασβεστίου για παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα (Vandamme *et al.*, 2012; Safi *et al.*, 2014).

Η μέθοδος της επίπλευσης αποσκοπεί στην ανάδυση των κυττάρων της χλωρέλλας στην επιφάνεια της καλλιέργειας, μέσω έγχυσης σε αυτήν μικρο-φουσαλίδων αέρα. Οι φουσαλίδες παγιδεύουν και συμπαρασύρουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της καλλιέργειας από όπου και συλλέγονται στη συνέχεια. Η επίπλευση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με φυσικό τρόπο όταν η περιεκτικότητα του μικροφύκου σε λιπίδια είναι αυξημένη (Safi *et al.*, 2014). Οι Cheng *et al.*, (2010) πρότειναν ως αποτελεσματική μέθοδο επίπλευσης της *C.vulgaris* τη διασπορά αερίου όζοντος στο μέσο ανάπτυξης του μικροφύκου. Έτσι, σε αντίθεση με τη προηγούμενη μέθοδο, η επίπλευση δεν απαιτεί τη χρήση συνθετικών χημικών, ωστόσο η οικονομική της βιωσιμότητα σε βιομηχανική κλίμακα δεν είναι πλήρως γνωστή (Safi *et al.*, 2014).

Τέλος, το φιλτράρισμα συνήθως συνδυάζεται με μία από τις παραπάνω μεθόδους και εξαιτίας του μικρού μεγέθους της *C.vulgaris* εφαρμόζεται κυρίως η υπερδιήθηση ή η μικροδιήθηση για την απομόνωσή της από το μέσο ανάπτυξης. Η μέθοδος αυτή επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος του φίλτρου, η διαμεμβρανική πίεση που ασκείται, η ταχύτητα ροής και η φάση ανάπτυξης των κυττάρων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά την εφαρμογή της τεχνικής (Safi *et al.*, 2014).

1.4.2.3. Χημική Σύσταση Χλωρέλλας

Η σύσταση της χλωρέλλας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από διατροφικής άποψης, καθώς όπως και η σπιρουλίνα αποτελεί πλούσια πηγή φυτικών πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας παρέχοντας όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στον οργανισμό από την κατανάλωσή της. Επιπλέον, περιέχει πληθώρα βιταμινών, ιχνοστοιχείων, ωφέλιμων λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών ουσιών που της προσδίδουν αρκετές ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η χλωρέλλα περιέχει πρωτεΐνη σε ποσοστό 55-60%, 14-22% λιπαρά, 12-17% υδατάνθρακες, 1-4% χλωροφύλλη και 9-18% διαιτητικές ίνες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία (Rani *et al.*, 2018; Widyaningrum, & Prianto, 2021). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται αναλυτικά τα συστατικά της χλωρέλλας και η περιεκτικότητά τους σε 100 g του μικροφύκου.

Πίνακας 1.5:Σύσταση χλωρέλλας (*Chlorella vulgaris*) (Προσαρμοσμένο από Safi *et al.*, 2014).

| Μακροθρεπτικά συστατικά (%) | | Μέταλλα/Ιχνοστοιχεία (g/100g χλωρέλλας) | |
|------------------------------------|-------|---|-------|
| Πρωτεΐνη | 55-60 | Ασβέστιο (Ca) | 0,27 |
| Ολικά Λιπαρά | 5-40 | Σίδηρος (Fe) | 0,68 |
| | | Φώσφορος (P) | 0,96 |
| Υδατάνθρακες | 12-55 | Ιώδιο (I) | 0,13 |
| | | Μαγνήσιο (Mg) | 0,44 |
| Εδώδιμες Ίνες | 9-10 | Ψευδάργυρος (Zn) | 0,55 |
| | | Σελήνιο (Se) | ίχνη |
| Αμινοξέα (g/100g πρωτεΐνης) | | Χαλκός (Cu) | 0,19 |
| Ισολευκίνη | 3,2 | Μαγγάνιο (Mn) | 0,4 |
| Λευκίνη | 9,5 | Χρόμιο (Cr) | ίχνη |
| Λυσίνη | 6,4 | Κάλιο (K) | 2,15 |
| Μεθειονίνη | 1,3 | Νάτριο (Na) | ίχνη |
| Φαινυλαλανίνη | 5,5 | Βιταμίνες (mg/100 g χλωρέλλας) | |
| Θρεονίνη | 5,3 | Βιταμίνη B1 (Θειαμίνη) | 1,5 |
| Τρυπτοφάνη | 2,21 | Βιταμίνη B2 (Ριβοφλαβίνη) | 4,8 |
| Βαλίνη | 7 | Βιταμίνη B3 (Νιασίνη) | 23,8 |
| Ιστιδίνη | 2 | Βιταμίνη B5 (Παντοθενικό οξύ) | 1,3 |
| Αλανίνη | 9,4 | Βιταμίνη B6 (Πυριδοξίνη) | 1,7 |
| Αργινίνη | 6,9 | Βιταμίνη B7 (Βιοτίνη) | 191,6 |
| Ασπαρτικό οξύ | 9,3 | Βιταμίνη B9 Φυλλικό οξύ | 26,9 |
| Κυστεΐνη | 0,19 | Βιταμίνη B12 (Κοβαλαμίνη) | 125,9 |
| Γλουταμινικό οξύ | 13,7 | Βιταμίνη E (Τοκοφερόλη) | 7,78 |
| Γλυκίνη | 6,3 | Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ) | 15,6 |
| Προλίνη | 5 | Ινοσιτόλη | ίχνη |
| Σερίνη | 5,8 | Χολίνη | ίχνη |
| Τυροσίνη | 2,8 | Βιταμίνη A (Ρετινόλη) | ίχνη |

I. Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα της *C.vulgaris* σε πρωτεΐνες επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης και τον τρόπο συγκομιδής της. Με την αυτότροφη ανάπτυξη και τη συλλογή με φυγοκέντρηση επιτυγχάνονται οι λιγότερες απώλειες. Από το σύνολο των πρωτεϊνών της χλωρέλλας το 20% βρίσκεται προσδεμένο στο κυτταρικό τοίχωμα, ένα ποσοστό πάνω από 50% βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου και το 30% περίπου διακινούνται μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντός του (Safi *et al.*, 2014). Έτσι, το ποσοστό της πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο μικροφύκος (60%) είναι τρεις φορές πιο υψηλό από του βόειου κρέατος, του αυγού και της σόγιας που αποτελούν σημαντικές πηγές διαθέσιμων πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα ξεπερνά και την περιεκτικότητα όμοιων ειδών του (Rani *et al.*, 2018). Η θρεπτική ποιότητα

των πρωτεϊνών καθορίζεται από το προφίλ των αμινοξέων του και όπως στα περισσότερα μικροφύκη έτσι και στη χλωρέλλα οι πρωτεΐνες της συνίστανται από όλα τα απαραίτητα και ορισμένα μη απαραίτητα αμινοξέα καλύπτοντας πλήρως της ανάγκες ενός παιδιού ή ενήλικα σε αυτές (Safi *et al.*, 2014). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν εξαιρετες γαλακτοματοποιητικές ιδιότητες (Ursu *et al.*, 2014), είναι εύπεπτες και τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από την πέψη τους παρέχουν πολλά οφέλη για την υγεία (Rani *et al.*, 2018).

II. Λιπίδια

Τα λιπίδια της χλωρέλλας αποτελούνται κυρίως από γλυκολιπίδια, φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα σε μικρότερο ποσοστό. Κατά κύριο λόγο το φύκος συνθέτει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (Polyunsaturated fatty acids-PUFAs) (Widyaningrum & Prianto, 2021). Η σύνθεσή τους λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και δομούν το κυτταρικό τοίχωμα και τις μεμβράνες οργανιδίων (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες). Η περιεκτικότητά τους επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης και μπορεί να φτάσει σε ποσοστό 58% όταν αυτές είναι ιδανικές (Safi *et al.*, 2014). Τα βασικότερα λιπαρά οξέα με σημαντική συμβολή στην υγεία που περιέχονται στη χλωρέλλα είναι το ολεϊκό οξύ σε ποσοστό 35,1% (w/w), και ακολουθούν τα απαραίτητα οξέα παλμιτικό, λινολενικό και λιγνελαιϊκό οξύ (α- και γ- λιγνελαιϊκό οξύ) (Mendes *et al.*, 1995; Rani *et al.*, 2018; Widyaningrum & Prianto, 2021).

III. Υδατάνθρακες

Το άμυλο (αμυλόζη + αμυλοπηκτίνη) αποτελεί τον πιο άφθονο υδατάνθρακα της *C. vulgaris*. Βρίσκεται στους χλωροπλάστες και μαζί με τα άλλα σάκχαρα χρησιμεύει ως αποθήκη ενέργειας για το κύτταρο (Safi *et al.*, 2014). Εκτός από το άμυλο, ένας βασικός πολυσακχαρίτης της χλωρέλλας είναι η υδατοδιαλυτή β-1,3 γλυκάνη που δρα ως αντιοξειδωτικό, ανοσοδιεγερτικό, βοηθάει στη πέψη και μειώνει αποτελεσματικά το επίπεδο των λιπιδίων στο αίμα συμβάλλοντας σημαντικά στη προαγωγή της υγείας (Spolaore *et al.*, 2006; Hyrslova *et al.*, 2021). Επιπλέον, η χλωρέλλα διαθέτει ένα αξιοσημείωτα ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από τους πολυσακχαρίτες κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, καθώς και πρωτεΐνες λιπίδια και μέταλλα (Abo-Shady *et al.*, 1993). Η σύνθεση των σακχάρων του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί ένα μείγμα από ραμνόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη και μαννόζη με κυρίαρχο σάκχαρο τη ραμνόζη (Safi *et al.*, 2014). Οι Armstrong *et al.*, (2002) παρατήρησαν επίσης τη παρουσία μορίων όμοιων με λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide-LPS) βακτηρίων στο κυτταρικό τοίχωμα της χλωρέλλας. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει τον ισχυρισμό ότι το LPS πιθανόν να μην αποτελεί μόνο συστατικό των προκαρυωτικών μικροοργανισμών αλλά και ορισμένων ευκαρυωτικών. Το LPS έχει βρεθεί πως πυροδοτεί τη

φλεγμονώδη απόκριση ωστόσο δεν είναι γνωστό αν τα μόρια που εντοπίστηκαν στη χλωρέλλα εμφανίζουν αντίστοιχη δράση (Ahmad *et al.*, 2020).

IV. Βιταμίνες και μέταλλα

Οι βιταμίνες και τα μέταλλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Η χλωρέλλα περιέχει επαρκείς ποσότητες αυτών, ικανών να καλύψουν τις καθημερινές διατροφικές και λειτουργικές ανάγκες παιδιών και ενηλίκων (Rani *et al.*, 2018). Συγκεκριμένα, μερικές από τις βιταμίνες που περιέχει σε σημαντικές ποσότητες είναι το β-καροτένιο που αποτελεί πρόδρομη ένωση της βιταμίνης Α (προ-βιταμίνη Α), οι βιταμίνες Β1, Β2, Β3, Β5, Β6, η βιταμίνη Ε και Κ, το φυλλικό οξύ, η βιοτίνη και η βιταμίνη Β12. Σε μικρότερες ποσότητες ανευρίσκονται, η ινοσιτόλη, και η χολίνη. Από τα μέταλλα, στο φύκος κυριαρχούν το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), το Κάλιο (K), ο σίδηρος (Fe) και ο φώσφορος (P) (Safi *et al.*, 2014; Rani *et al.*, 2018) (**Πίνακας 1.5**).

V. Χρωστικές

Η χλωρέλλα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε χρωστικές όπως χλωροφύλλες (πράσινη χρωστική φωτοσυνθετικών φυτών) και καροτενοϊδή (χρωστική με εύρος χρώματος από κίτρινο έως κόκκινο) τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις ευεργετικές ιδιότητες που επιφέρουν στην υγεία. Η συγκέντρωσή τους στο φύκος μεταβάλλεται ανάλογα το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας (Widyaningrum & Prianto, 2021). Η πιο άφθονη χρωστική της χλωρέλλας είναι η χλωροφύλλη (χλωροφύλλη-α και χλωροφύλλη-β) που βρίσκεται στα θυλακοειδή και ξεπερνά κατά 4 φορές τη περιεκτικότητα της σπιρουλίνας και άλλων ανώτερων φυτών όπως το σπανάκι και η τσουκνίδα. Η περιεκτικότητα της χρωστικής φτάνει στο 1-4% της ξηρής ουσίας του φύκου, και μερικά από τα οφέλη της για την υγεία περιλαμβάνουν τη θεραπεία από έλκη, ρύθμιση της έμμηνης ρύσης, συμβολή στη βελτίωση του διαβήτη και του άσθματος καθώς και στην αύξηση των κυττάρων του αίματος (Safi *et al.*, 2014; Rani *et al.*, 2018). Η χλωροφύλλη-α αποτελεί συστατικό όλων των φωτοσυνθετικών μικροφυκών, με εξαίρεση τα κυανοβακτήρια, και στη χλωρέλλα ανευρίσκεται σε συγκέντρωση 2,5-17,5 mg/g, ενώ η χλωροφύλλη-β βρίσκεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στα πράσινα άλγη (**Πίνακας 1.5**) (Ahmad *et al.*, 2020). Επιπλέον, η χλωρέλλα περιέχει διάφορα είδη καροτενοϊδών όπως β-καροτένιο, α-καροτένιο, λουτεΐνη, και ξανθοφύλλες (ασταξανθίνη, κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη, βιολαξανθίνη κ.α.) τα οποία συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, την προστασία από χρόνιες παθήσεις (π.χ. καρδιακές) και φέρουν αντιοξειδωτική δράση (Safi *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2020; Widyaningrum & Prianto, 2021). Από όλα τα καροτενοϊδή, η λουτεΐνη είναι η πιο άφθονη στα κύτταρα της *C. vulgaris* (52-3830

μg/g) και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής ή ως πρόσθετο ζωοτροφών για τις ανοσοενισχυτικές της ιδιότητες (Ahmad *et al.*, 2020; Widyaningrum & Prianto, 2021).

VI. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν στους προστατευτικούς μηχανισμούς των μικροφυκών κατά των βακτηρίων, την υπεριώδη ακτινοβολία και τη μόλυνση από μέταλλα. Επιπλέον, παρέχουν προστασία των κυτταρικών μεμβρανών, των νουκλεϊκών οξέων, των δομικών πρωτεϊνών και των ενζύμων κατά των ελεύθερων ριζών. Στη *C. Vulgaris* έχουν βρεθεί φαινολικές ενώσεις όπως η φθορογλουκινόλη, το φερουλικό οξύ, η απιγενίνη και το p-κουμαρικό οξύ τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιβακτηριακή δράση κατά των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Proteus vulgaris* δίνοντας στη χλωρέλλα αρκετές προοπτικές για τη χρήση της ως συστατικό διαφόρων λειτουργικών τροφίμων (Widyaningrum & Prianto, 2021).

1.4.2.4. Η Χλωρέλλα ως Λειτουργικό Τρόφιμο

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα (**Ενότητα 1.3.**) τα λειτουργικά τρόφιμα αποτελούν μια κατηγορία τροφίμων για τα οποία μελέτες καταδεικνύουν ενδεχόμενες ευεργετικές δράσεις εντός του ανθρώπινου οργανισμού που οφείλονται στα βιολειτουργικά συστατικά που περιέχουν. Τα τελευταία χρόνια, οι σύγχρονοι ρυθμοί ζωής έχουν οδηγήσει σε ραγδαία διάδοση των τροφίμων αυτών καθώς ολοένα και περισσότεροι καταναλωτές αναζητούν διατροφικά πρότυπα για την προάσπιση της υγείας τους (Κουτελιδάκης, 2015²). Έτσι, αρκετές έρευνες έχουν αφιερωθεί στη μελέτη βιολειτουργικών συστατικών διαφόρων τροφίμων, τα οποία μπορούν να απομονωθούν με διάφορες τεχνικές και να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή συμπληρωμάτων ή καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα φυσικά συστατικά. Ένα τέτοιο τρόφιμο αποτελεί και η χλωρέλλα, η οποία πέρα από την υψηλή θρεπτική της αξία περιέχει μεγάλο αριθμό φυσικών βιολειτουργικών συστατικών όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοΐδη), φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία τα οποία είναι υπεύθυνα για ένα σύνολο θεραπευτικών ιδιοτήτων του φύκου τόσο σε ζωικά όσο και σε ανθρώπινα πειραματικά μοντέλα (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδης, ανοσορυθμιστικές, αντικαρκινικές, αντιπηκτικές, αντικές, αντιμυκητιακές) (Sedighi *et al.*, 2016; Niccolai *et al.*, 2019; Hyrslova *et al.*, 2021; Widyaningrum & Prianto, 2021). Επιπλέον, η χλωρέλλα είναι από τα λίγα μικροφύκη που έχουν αναγνωριστεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ ως ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση όταν καλλιεργείται και παράγεται υπό κατάλληλες συνθήκες υγιεινής (GRAS-Generally Recognized as Safe) και έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (Torres-Tiji *et al.*,

2020; Hysrlova *et al.*, 2021; Widyaningrum & Prianto, 2021). Συνεπώς, θεωρείται σημαντικό λειτουργικό τρόφιμο ως έχει, ενώ ταυτόχρονα διαφορετικές μορφές της βιομάζας της χλωρέλλας και εκχυλίσματα των συστατικών της χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ευρέως φάσματος διατροφικών συμπληρωμάτων και νέων λειτουργικών τροφίμων όπως γιαούρτια, τυριά (σε συνδυασμό με προβιοτικά στελέχη) και προϊόντα αρτοποιίας (Sedighi *et al.*, 2016; Camacho *et al.*, 2019; Hysrlova *et al.*, 2021; Widyaningrum & Prianto, 2021).

1.4.2.5. Τα Βιοενεργά Πεπτίδια της Χλωρέλλας

Εκτός από τα βιολειτουργικά συστατικά, η υψηλή περιεκτικότητα της χλωρέλλας σε πρωτεΐνη υψηλής βιολογικής αξίας, την καθιστά σημαντική πηγή απαραίτητων αμινοξέων καθώς και βιοενεργών πεπτιδίων με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Τα πεπτίδια αυτά απελευθερώνονται από την υδρόλυση των πρωτεϊνών του φύκου από πεπτικά ένζυμα (πρωτεάσες) π.χ. κατά τη γαστρεντερική πέψη. Συγκεκριμένα, στη *Chlorella vulgaris* έχουν εντοπισθεί πεπτίδια με αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, ανοσορυθμιστική και αντιυπερτασική δράση σε *in vitro* μοντέλα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και *in vivo* σε ζώα, από την υδρόλυση με διάφορα πεπτικά ένζυμα όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.6** (Suetsuna & Chen, 2001; Morris *et al.*, 2009; Sheih *et al.*, 2009; Chalamaiah *et al.*, 2018; Sedighi *et al.*, 2019). Τα πρωτεϊνικά αυτά υδρολύματα παρουσιάζουν προοπτικές στη χρήση τους ως συστατικά λειτουργικών τροφίμων, συμπληρώματα διατροφής, ακόμα και ως συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων με στόχο την θωράκιση της υγείας (Morris *et al.*, 2009; Κουτελιδάκης, 2015²; Sedighi *et al.*, 2019). Ωστόσο, το ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα χιτίνης και κυτταρίνης που διαθέτουν τα κύτταρα της χλωρέλλας μειώνει την πεπτικότητα των πρωτεϊνών της αλλά και τα οφέλη που μπορεί να απολάβει ο ανθρώπινος οργανισμός από αυτές, όταν τα κύτταρα είναι άθικτα. Επομένως, η ενζυμική υδρόλυση έχει προταθεί ως μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την αύξηση της πεπτικότητας των πρωτεϊνών καθώς και για τη λήψη πρωτεϊνικών υδρολυμάτων με βελτιωμένες θρεπτικές και λειτουργικές ιδιότητες (Morris *et al.*, 2009; Sedighi *et al.*, 2019; Widyaningrum & Prianto, 2021). Από πρακτικής άποψης, συχνότερες πηγές υδρολυμάτων που χρησιμοποιούνται για διατροφικούς σκοπούς αποτελούν οι πρωτεΐνες του γάλακτος. Η δυνατότητα όμως των φυτικών πρωτεϊνών να παράγουν βιοενεργά πεπτίδια προσφέρει νέες ευκαιρίες στην έρευνα των μικροφυκών (Morris *et al.*, 2009).

Πίνακας 1.6: Βιοενεργά πεπτίδια χλωρέλλας και οι βιολειτουργικές τους ιδιότητες.

| Αλληλουχία πεπτιδίων | Πρωτεολυτικά ένζυμα/ Μέθοδος απομόνωσης | Στέλεχος προέλευσης | Βιολειτουργικές ιδιότητες | Αναφορές |
|--|---|---------------------------|--|---|
| VECYGPNRPQF | Πεψίνη | <i>Chlorella vulgaris</i> | Αντιοξειδωτική | Sheih <i>et al.</i> (2009) ² |
| | | | Αντικαρκινική (Αναστολή πολλαπλασιασμού ανθρώπινης γαστρικής καρκινικής σειράς AGS) | Sheih <i>et al.</i> (2010) |
| IVVG | Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης | <i>Chlorella vulgaris</i> | Αντιυπερτασική (ACE-I παρεμπόδιση) | Suetsuna & Chen (2001) |
| AFL | | | | |
| FAL | | | | |
| AGL | | | | |
| VVPPA | | | | |
| VGCYGPNRPQF | Πεψίνη, Αλκαλάση, Παπαΐνη | | | Sheih <i>et al.</i> (2009) ¹ |
| Τρία κύρια πεπτίδια με μοριακές μάζες μεταξύ 2 και 5 kDa | Παγκρεατίνη | <i>Chlorella vulgaris</i> | Ανοσορυθμιστική (Ενίσχυση αιμοποίησης, αύξηση αριθμού λευκοκυττάρων και δραστηριότητας των μακροφάγων, διέγερση ανοσολογικών λειτουργιών σε ποντίκια <i>in vivo.</i>) | Morris <i>et al.</i> (2009,2010) |
| Πεπτίδια μοριακής μάζας 62 kDa | Πεψίνη | <i>Chlorella vulgaris</i> | Αντιμικροβιακή κατά του <i>E. coli</i> | Sedighi <i>et al.</i> 2016 |
| | | | Αντικαρκινική (Αναστολή κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού) | |

1.5. Γιαούρτι

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) (2009) ως «Γιαούρτι» χαρακτηρίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιεργειών-εκκινητών *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει 10⁷ cfu/g ζώντων οξυγαλακτικών βακτηρίων μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του. Το γιαούρτι αποτελεί το πιο διαδεδομένο προϊόν ζύμωσης του γάλακτος που παράγεται από

πλήρες ή αποκορυφωμένο γάλα. Είναι αποτέλεσμα της γαλακτικής ζύμωσης της λακτόζης του γάλακτος από τα δύο θερμοφιλά γαλακτικά βακτήρια που προστίθενται σε αυτό. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια αυτά ζυμώνουν τη λακτόζη του γάλακτος προς παραγωγή γαλακτικού οξέος το οποίο προκαλεί μείωση του pH. Η πτώση του pH στο 4,6 (ισοηλεκτρικό σημείο καζεϊνών) προκαλεί όξινη πήξη στο γάλα και το σχηματισμό πήγματος γιαουρτιού. Τα δύο αυτά οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται και παράγουν γρήγορα οξύτητα στο γάλα λόγω της συμβίωσής τους, καθώς το ένα ενισχύει την ανάπτυξη του άλλου διαμέσου των προϊόντων του μεταβολισμού τους (Μοάτσου, 2009).

Ιστορικά, ο κύριος λόγος που οι άνθρωποι οδηγήθηκαν στην παρασκευή γιαουρτιού ήταν προκειμένου να αυξηθεί η διάρκεια ζωής του γάλακτος το οποίο διαχρονικά συνιστά τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας, ενώ ταυτόχρονα παράγεται ένα προϊόν με διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και πιο εύπεπτο (Sfakianakis & Tzia, 2014; Μάντης *et al.*, 2015). Το γιαούρτι ήταν πολύ γνωστό στην ελληνική και ρωμαϊκή αυτοκρατορία με τους Έλληνες να είναι οι πρώτοι που το ανέφεραν σε γραπτές αναφορές το 100 π.Χ. Στις αρχές του 20ού αιώνα έγινε γνωστό για τα οφέλη του στην υγεία και ξεκίνησε η πώλησή του στα φαρμακεία ως φάρμακο. Βρήκε εμπορική επιτυχία όταν ο Isaac Carasso (γεννημένος το 1874 στη Θεσσαλονίκη) ξεκίνησε να φτιάχνει γιαούρτι με μαρμελάδες στη Βαρκελώνη για να βοηθήσει παιδιά με εντερικές λοιμώξεις και ίδρυσε μια μικρή επιχείρηση παραγωγής γιαουρτιού την Danone χρησιμοποιώντας καλλιέργειες από το Ινστιτούτο Παστέρ. Στη συνέχεια, το 1932 ο γιος του, Daniel Carasso, εγκατέστησε την επιχείρηση στη Γαλλία που αποτέλεσε το πρώτο εργαστήριο και εργοστάσιο παραγωγής γιαουρτιού (Fisberg & Machado, 2015).

Σήμερα στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφορα είδη γιαουρτιών τα οποία διακρίνονται μεταξύ τους ως προς τη λιποπεριεκτικότητα, την τεχνολογία παρασκευής και τα πρόσθετα (γλυκαντικές ύλες, φρούτα, αρώματα, χρωστικές). Ο βαθμός κατανάλωσης του κάθε είδους ανά τον κόσμο διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα και επηρεάζεται από τον τρόπο ζωής, τη κουλτούρα και τις παραδόσεις του κάθε πολιτισμού (Fisberg & Machado, 2015). Σύμφωνα με έρευνα έχει βρεθεί πως οι χώρες που καταναλώνουν τις μεγαλύτερες ποσότητες γιαουρτιού είναι η Ολλανδία, Γαλλία, Γερμανία και Ισπανία ενώ η μικρότερη κατανάλωση παρατηρείται στις χώρες Αίγυπτος, Ρωσία, Ρουμανία και Νότια Αφρική. Επιπλέον, στην Αμερική και τη Βραζιλία μόνο το 6% του πληθυσμού καταναλώνει γιαούρτι σε καθημερινή βάση (Danone Nutricia Research, 2013). Η μειωμένη κατανάλωση γιαουρτιού από τους πληθυσμούς αυτούς στερεί τα πολλαπλά ευεργετικά οφέλη για την υγεία που μπορούν να αποκομίσουν καθώς είναι πλέον γνωστό πως το προϊόν αυτό είναι υψηλής θρεπτικής αξίας και αποτελεί πλούσια πηγή

βιοδιαθέσιμων πρωτεϊνών, ασβεστίου, φωσφόρου, βιταμινών και προβιοτικών μικροοργανισμών (Fisberg & Machado, 2015).

Ανεξάρτητα από τα είδη γιαουρτιών που υπάρχουν και τις σύγχρονες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους, εφαρμόζονται ορισμένες βασικές επεξεργασίες προκειμένου να γίνει δυνατή η παραγωγή του προϊόντος και οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.

1.5.1. Παραγωγή Γιαουρτιού

1.5.1.1. Πρώτες ύλες

Α) Γάλα: Για την παραγωγή του γιαουρτιού στις περισσότερες δυτικές χώρες χρησιμοποιείται κυρίως αγελαδινό γάλα ενώ σε ορισμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, παράγεται από πρόβειο, αίγιο ή γάλα βουβάλας. Το γάλα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί τυποποιείται ως προς τη λιποπεριεκτικότητα (με προσθήκη/αφαίρεση κρέμας γάλακτος) και το ποσοστό των μη λιπαρών στερεών συστατικών (Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους-ΣΥΑΛ) που περιέχει, ώστε το τελικό προϊόν να ανταποκρίνεται στις εκάστοτε νομοθετικές απαιτήσεις και τις προτιμήσεις των καταναλωτών (Sfakianakis & Tzia, 2014). Η αύξηση του ΣΥΑΛ αφορά κυρίως τις ολικές πρωτεΐνες του γάλακτος και πραγματοποιείται για τεχνολογικούς και οργανοληπτικούς λόγους, είτε με αφαίρεση νερού (εξάτμιση υπό κενό, υπερδιήθηση) είτε με προσθήκη στερεών συστατικών (απομονωμένες πρωτεΐνες γάλακτος ή τυρογάλακτος σε μορφή σκόνης) (Μάντης *et al.*, 2015) υπό την προϋπόθεση ότι η αύξηση του ΣΥΑΛ στο γιαούρτι δε θα ξεπερνά το ΣΥΑΛ του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε κατά 4 μονάδες (ΚΤΠ, άρθρο 82). Με εξαίρεση την περίπτωση των πρωτεϊνών, η ελληνική νομοθεσία δεν επιτρέπει τη χρήση ολικά αφυδατωμένου γάλακτος ή παραγώγων του σε μορφή σκόνης για τη ρύθμιση του ΣΥΑΛ (ΚΤΠ, άρθρο 82). Επιπλέον, σύμφωνα με τον ΚΤΠ (2009) η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο γιαούρτι από αγελαδινό ή αίγιο γάλα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,2% και από πρόβειο γάλα τουλάχιστον 5,5%. Σε περίπτωση χρήσης μιγμάτων γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίζεται από την αναλογία των ειδών γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν. Είναι σημαντικό το γάλα που προορίζεται για παρασκευή γιαουρτιού να έχει χαμηλό μικροβιακό φορτίο και να είναι καθαρισμένο από ξένες ύλες (με φιλτράρισμα, συνήθως) που πιθανόν να προέρχονται από το ζώο ή το περιβάλλον και ελεγμένο ως προς την παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (αντιβιοτικά, απολυμαντικά και απορρυπαντικά που εφαρμόζονται για την εξυγίανση του εξοπλισμού συλλογής, αποθήκευσης και μεταφοράς του γάλακτος) που επιβραδύνουν ή αναστέλλουν πλήρως τον πολλαπλασιασμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων προκαλώντας διαταραχές στην πήξη του γάλακτος (Μάντης *et al.*, 2015).

Β) Οξυγαλακτική καλλιέργεια: Αποτελεί μίγμα των βακτηρίων *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* που προστίθενται απευθείας στο γάλα σε υγρή μορφή ή μορφή σκόνης (λυοφιλοποιημένα ή κατεψυγμένα). Σε μικρής κλίμακας παραγωγή γιαουρτιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και γιαούρτι προηγούμενης ημέρας ως καλλιέργεια ενώ σε μεγάλες γαλακτοβιομηχανίες χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες σε μορφή σκόνης ($>10^{10}$ cfu/g προϊόντος). Οι υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται λιγότερο καθώς ενέχουν τον κίνδυνο επιμολύνσεων ή εξασθένησής τους λόγω αλληπάλληλων ανακαλλιεργειών. Εκτός από τη βασική καλλιέργεια οι εναρκτήριες καλλιέργειες μπορούν να περιέχουν και άλλα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Bifidobacterium* κ.α.) με πληθυσμό τουλάχιστον 10^6 cfu/gr προϊόντος έως την ημερομηνία ανάλωσης και τα οποία πρέπει να επισημαίνονται στο τελικό προϊόν (Sfakianakis & Tzia, 2014; Μάντης *et al.*, 2015). Τα βακτήρια αυτά έχουν μικρότερη πρωτεολυτική ικανότητα και ταχύτητα ανάπτυξης από τη καλλιέργεια εκκίνησης του γιαουρτιού και για το λόγο αυτό προστίθενται συμπληρωματικά (Kanekanian, 2014). Τέλος, η καλλιέργεια πρέπει να είναι απαλλαγμένη από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς και βακτηριοφάγους οι οποίοι μπορούν να την εξασθενίσουν ή να την καταστρέψουν (Μάντης *et al.*, 2015).

1.5.1.2. Βασικά στάδια παρασκευής

Η παραγωγή του γιαουρτιού όπως και κάθε άλλου τροφίμου πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγιεινής και τα υλικά, τα σκεύη και τα μηχανήματα με τα οποία έρχεται σε επαφή το προϊόν να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς (παθογόνους και μη) που μπορούν να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στις τεχνολογικές διεργασίες παραγωγής του αλλά και να υποβαθμίσουν την ποιότητά του.

I. Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση αποτελεί την κύρια μέθοδο σταθεροποίησης του γαλακτώματος λίπους στο γάλα και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων και την αύξηση του αριθμού και της επιφάνειάς τους στο γάλα. Σκοπός είναι η μείωση της ανόδου των λιποσφαιρίων στην επιφάνεια του γάλακτος λόγω διαφοράς πυκνότητας (φυσική αποκορύφωση), ένα φαινόμενο που παρατηρείται όταν το γάλα αφεθεί σε ηρεμία. Η ομογενοποίηση οδηγεί στη λεύκανση του γάλακτος καθώς και τη βελτίωση της γεύσης και δομής του γιαουρτιού (ομοιογένεια, περιορισμός διαχωρισμού του ορού από το πήγμα, δηλαδή του φαινομένου συναίρεσης). Επιτυγχάνεται μέσω διέλευσης του γάλακτος από πολύ μικρή οπή του ειδικού ομογενοποιητή σε συνθήκες πίεσης περίπου 10-20 MPa. Ωστόσο, το στάδιο αυτό δεν εφαρμόζεται για την παρασκευή όλων των ειδών γιαουρτιού. Στο παραδοσιακό γιαούρτι για παράδειγμα το φαινόμενο της αποκορύφωσης είναι επιθυμητό για τον σχηματισμό

της «πέτσας» και για το λόγο αυτό το γάλα δεν ομογενοποιείται. Το γάλα που πρόκειται να ομογενοποιηθεί συνήθως προθερμαίνεται στους 60-70°C (Καμινारीδης & Μοάτσου, 2009; Koranos *et al.*, 2010; Sfakianakis & Tzia, 2014; Chandan, 2017).

II. Θέρμανση του γάλακτος

Βασικό στάδιο για τη παρασκευή γιαουρτιού συνιστά η αποτελεσματική θέρμανση του γάλακτος η οποία συνήθως πραγματοποιείται στους 85-95 °C για 5-30'. Σκοπός αυτής της θερμικής επεξεργασίας εκτός από την καταστροφή των παθογόνων/αλλοιογόνων μικροοργανισμών και την εξυγίανση του γάλακτος η οποία επιτυγχάνεται και σε ηπιότερους συνδυασμούς θερμοκρασίας-χρόνου θέρμανσης, είναι κυρίως η αδρανοποίηση πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων (ενδογενής λιπάσες και πρωτεάσες) που μπορούν να προκαλέσουν υδρολυτική τάγγιση και πικρή γεύση στο τελικό προϊόν, καθώς και η πρόκληση ορισμένων μεταβολών στη σύσταση του γάλακτος. Η βασικότερη, από τεχνολογική άποψη, από αυτές τις μεταβολές είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού (που επιτυγχάνεται με θέρμανση > 80 °C για > 5' και προκαλεί μετουσίωση κατά 80-85%), η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό υδρόφιλου συμπλόκου α -La/ β -Lg/ κ -καζεΐνη που αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης ύδατος (ΙΣΥ), μειώνει το φαινόμενο της συναίρεσης και βελτιώνει τη δομή του προϊόντος (αύξηση ιξώδους και σταθερότητα πήγματος) (Μάντης *et al.*, 2015; Chandan, 2017). Ο βαθμός μετουσίωσης των οροπρωτεϊνών επηρεάζεται τόσο από το συνδυασμό θερμοκρασίας-χρόνου θέρμανσης όσο και από την περιεκτικότητα του γάλακτος σε στερεά συστατικά. Άλλες μεταβολές που προκαλεί η θέρμανση στα συστατικά του γιαουρτιού είναι η μερική υδρόλυση των καζεϊνών που επιδρά στην πεπτικότητά τους και στη γεύση, η αποδόμηση των ελεύθερων αμινοξέων που συμβάλλουν στη διαμόρφωση επιθυμητού αρώματος και γεύσης, η αποδόμηση των υδατανθράκων προς οργανικά οξέα και η αντίδραση των σακχάρων με αμινοξέα (αντίδραση Maillard) που επηρεάζουν την οξύτητα και το άρωμα αντίστοιχα, ο σχηματισμός λακτονών από λιπίδια που συμβάλλουν στη γεύση και η μείωση του διαλυμένου O₂ που ευνοεί την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Sfakianakis & Tzia, 2014; Μάντης *et al.*, 2015).

III. Ψύξη -Προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας

Μετά τη θέρμανση και ομογενοποίηση το γάλα ψύχεται στους 40-43°C και ενοφθαλμίζεται με την καλλιέργεια των βακτηρίων *St. thermophilus* και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* σε ποσότητα που εξαρτάται από τη μορφή που χρησιμοποιείται. Έτσι, για την υγρή μορφή προστίθεται καλλιέργεια σε ποσοστό 0,5-3% της ποσότητας του γάλακτος που πρόκειται να ζυμωθεί, ενώ για τη λυοφιλοποιημένη μορφή ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή. Η πληθυσμιακή αναλογία *St. thermophilus*/*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* μπορεί να είναι της

τάξης 3:1, 3:2, 2:1, 2:3 ή 1:1 και εξαρτάται από τη ποσότητα της καλλιέργειας, τη θερμοκρασία επώασης και την επιθυμητή οξύτητα του προϊόντος. Στην περίπτωση του κλασσικού γιαουρτιού χρησιμοποιείται ενοφθάλμισμα 1-2% σε αναλογία 1:1 (Κορανός *et al.*, 2010; Μάντης *et al.*, 2015; Chandan, 2017).

IV. Επώαση-Πήξη

Στη συνέχεια, το γάλα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 41-43 °C για 3 ώρες που αποτελούν τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του συνδυασμού των βακτηρίων (*St. Thermophilus*- 35-43°C και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*-43-46°C βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης) (Μάντης *et al.*, 2015). Στο διάστημα αυτό το γάλα πήζει από τη δράση της καλλιέργειας και μετατρέπεται σε γιαούρτι. Συγκεκριμένα, πιο γρήγορα αναπτύσσεται ο *Str. thermophilus* παράγοντας περισσότερο γαλακτικό οξύ και δημιουργώντας ένα ευνοϊκό όξινο περιβάλλον για την ανάπτυξη του *Lb. subsp. bulgaricus*. Επιπλέον, η παραγωγή CO₂ και μυρμηκικού οξέος από τον πολλαπλασιασμό του *Str. Thermophilus* έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη του *Lb. subsp bulgaricus*. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεολυτική δράση του *Lb. subsp. bulgaricus* καλύπτει τις ανάγκες του *Str. Thermophilus* σε πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα (Μοάτσου, 2009; Kanekanian, 2014; Μάντης *et al.*, 2015). Συνεπώς, η συνεργιστική αυτή δράση των δύο βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης και την αύξηση της οξύτητας σε τιμές pH κοντά στο 5,3 αρχικά από τη δράση του *Str. Thermophilus* και σε 4,6-4,7 στη συνέχεια από την ανάπτυξη του *Lb. subsp. bulgaricus* (Chandan, 2017). Σε αυτές τις τιμές pH τα καζεϊνικά μικκύλια του γάλακτος αποδιατάσσονται (απομάκρυνση κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου από μικκύλια/αφαλάτωση) και συσσωματώνονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό συνεκτικού πήγματος που επιτείνεται με την παρεμβολή των μετουσιωμένων λόγω θέρμανσης πρωτεϊνών του ορού γάλακτος και συγκρατεί τον ορό του γάλακτος (Μάντης *et al.*, 2015).

V. Προσθήκη σταθεροποιητών

Σε ορισμένα είδη γιαουρτιού, κυρίως βιομηχανικού τύπου, γίνεται και προσθήκη σταθεροποιητών, δηλαδή υδροκολλοειδών ενώσεων φυτικής ή ζωικής προέλευσης όπως πηκτίνη, τροποποιημένο άμυλο (ταπιόκας ή αραβοσίτου) και κόμμεα. Οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ελεύθερο νερό που υπάρχει στο γιαούρτι δημιουργώντας μία δομή γέλης. Έτσι, περιορίζεται το φαινόμενο της συναίρεσης που είναι ανεπιθύμητο για τους περισσότερους καταναλωτές, αυξάνεται η συνεκτικότητα της δομής, το ιξώδες και η διάρκεια ζωής του προϊόντος και επιτυγχάνεται εύλογος βαθμός ομοιομορφίας μεταξύ των παρτίδων. Επιπλέον, ορισμένοι σταθεροποιητές προσδένονται στις καζεΐνες παρέχοντας επιπρόσθετο σώμα στο προϊόν και περαιτέρω προστασία κατά της συναίρεσης (Chandan, 2017).

VI. Συσκευασία-Ψύξη

Το γιαούρτι συσκευάζεται σε πλαστικούς περιέκτες (κύπελλα) από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), πολυστυρένιο ή πολυαιθυλένιο που το προστατεύουν από την αφυδάτωση, τις επιμολύνσεις και την απώλεια αρώματος (Μάντης *et al.*, 2015). Οι μικρές ποσότητες συσκευάζονται επίσης σε υάλινα ή πήλινα δοχεία. Έπειτα οι περιέκτες οδηγούνται σε τούνελ ψύξης για ταχεία ψύξη σε θερμοκρασία $\leq 5^{\circ}\text{C}$, ενώ σε μικρές μονάδες παραγωγής ψύχονται σε βιομηχανικά ψυγεία $< 10^{\circ}\text{C}$ (συνήθως $3-4^{\circ}\text{C}$) (Chandan, 2017). Όσο πιο κοντά είναι η θερμοκρασία συντήρησης στους 0°C τόσο επιμηκύνεται η διάρκεια ζωής του γιαουρτιού καθώς επιβραδύνεται περισσότερο η ενζυμική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που υποβαθμίζει τη ποιότητα του προϊόντος (Μάντης *et al.*, 2015). Ανάλογα τη θερμοκρασία συντήρησης, τη τιμή pH και τις επιμολύνσεις το γιαούρτι μπορεί να διατηρηθεί από λίγες μέρες (2-5) έως και μερικές εβδομάδες (Μάντης *et al.*, 2015; Chandan, 2017).

1.5.2. Κατηγορίες γιαουρτιού

Η εξέλιξη στην τεχνολογία παραγωγής γιαουρτιού έχει οδηγήσει στη διαφοροποίησή του σε πολλές κατηγορίες. Η μεγαλύτερη διάκριση αφορά το παραδοσιακό και το βιομηχανικό γιαούρτι, το οποίο διακρίνεται περαιτέρω σε συνεκτικό (set yoghurt) και αναδυόμενο (stirred yoghurt). Παρακάτω περιγράφονται τα κυριότερα είδη γιαουρτιού που κυκλοφορούν στο εμπόριο καθώς και τα στάδια παρασκευής τους.

1.5.2.1. Παραδοσιακό γιαούρτι

Η τεχνολογία παρασκευής του παραδοσιακού γιαουρτιού έχει προκύψει από τη συσσωρευμένη εμπειρία πολλών ετών. Στις μέρες μας, η γαλακτοβιομηχανία έχει διατηρήσει τη βασική τεχνολογία, ωστόσο έχει εκσυγχρονίσει τα στάδια παραγωγής για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υγιεινής και εμφάνισης του προϊόντος (Μάντης *et al.*, 2015).

Σύμφωνα με τον ΚΤΠ (2009), ως «παραδοσιακό» γιαούρτι ορίζεται εκείνο το προϊόν που πληροί τις ακόλουθες προδιαγραφές:

«α) Παρασκευάζεται με την παραδοσιακή μέθοδο ώστε να φέρει υμένα (πέτσα) στην επιφάνειά του.

β) Προκύπτει από την πήξη αποκλειστικά νοπού ή παστεριωμένου γάλακτος που δεν έχει υποστεί τροποποίηση της φυσικής του σύνθεσης με μόνη εξαίρεση τη ρύθμιση της λιποπεριεκτικότητας, έως του σημείου που είναι τεχνικά επιτεύξιμη η δημιουργία υμένα.»

Έτσι, το γάλα μετά τη θέρμανση διανέμεται στους περιέκτες όπου παραμένει χωρίς ανάδευση προκειμένου να σχηματιστεί η χαρακτηριστική επιδερμίδα (πέτσα) στην επιφάνειά του (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Σχηματισμός επιδερμίδας (πέτσας) στην επιφάνεια γάλακτος κατά την παρασκευή παραδοσιακού γιαουρτιού. (Εργαστήριο Τεχνολογίας Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2021).

Όταν η θερμοκρασία φτάσει περίπου στους 45°C, η επιδερμίδα ανασηκώνεται με προσοχή ώστε να μην καταστραφεί και γίνεται εμβολιασμός με ορισμένη ποσότητα γιαουρτιού προηγούμενης ημέρας η οποία αποτελεί την καλλιέργεια εκκίνησης. Για το στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται ειδικές σύριγγες εμβολιασμού (**Εικόνα 1.9**). Έπειτα, το προϊόν επωάζεται και ψύχεται (Μοάτσου, 2009; Μάντης *et al.*, 2015; Μασούρας, 2021). Ένα μειονέκτημα της χρήσης γιαουρτιού προηγούμενης ημέρας ως καλλιέργεια είναι τα ασταθή αποτελέσματα π.χ. ως προς τον βαθμό πήξης, τη συνεκτικότητα της δομής κ.τ.λ. (Μάντης *et al.*, 2015).

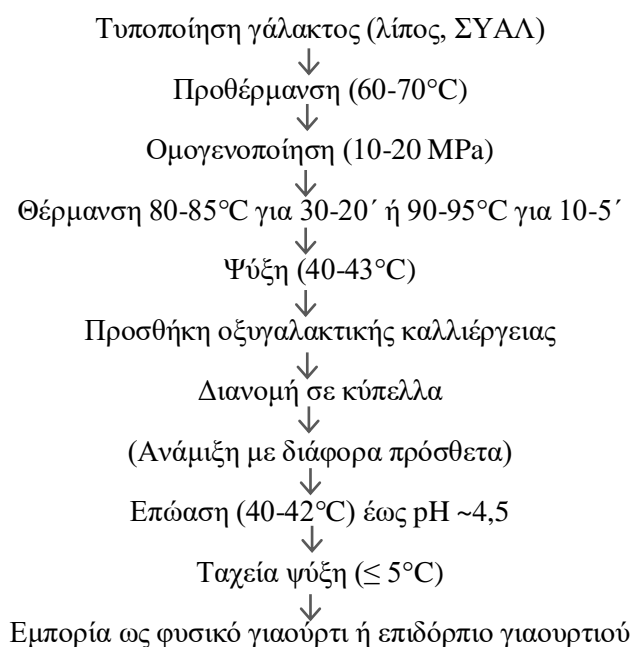


Εικόνα 1.9: Σύριγγες εμβολιασμού οξυγαλακτικής καλλιέργειας (Μασούρας, 2021).

1.5.2.2. Βιομηχανικό γιαούρτι

I. Συνεκτικό γιαούρτι (set yoghurt)

Το συνεκτικό γιαούρτι είναι το είδος που έχει επικρατήσει στη χώρα μας και παράγεται είτε ως φυσικό γιαούρτι είτε ως επιδόρπιο με φρούτα ή άλλα πρόσθετα. Αρχικά, για την παραγωγή του το γάλα ομογενοποιείται με αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται «πέτσα» στην επιφάνειά του. Έπειτα αφού προστεθεί η οξυγαλακτική καλλιέργεια το γάλα διανέμεται στους περιέκτες όπου και επώάζεται χωρίς ανάδευση με αποτέλεσμα να αποκτά ομοιόμορφη, λεία και συνεκτική δομή. Στο στάδιο αυτό γίνεται και η προσθήκη φρούτων, αρωμάτων και άλλων συστατικών σε περίπτωση παρασκευής επιδορπίου γιαουρτιού (Μάντης *et al.*, 2015). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συγκεκριμένη κατηγορία γιαουρτιού και τα συστατικά του μικροφύκους προστέθηκαν στο γάλα πριν την επώαση. Το διάγραμμα ροής παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα ροής παραγωγής συνεκτικού γιαουρτιού (προσαρμοσμένο από Μάντης *et al.*, 2015).

II. Αναδεδυμένο γιαούρτι (Stirred yoghurt)

Η κατηγορία αυτή διαφέρει από το συνεκτικό γιαούρτι στο ότι η επώαση του γάλακτος πραγματοποιείται σε δεξαμενές, όπου το πήγμα θραύεται, ψύχεται, αναδεύεται ή όχι με φρούτα και στη συνέχεια συσκευάζεται σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες (Μάντης *et al.*, 2015).

1.5.2.3. Στραγγιστό γιαούρτι

Το γιαούρτι αυτό διαθέτει αυξημένη αναλογία στερεών συστατικών (23-25%) και κυρίως πρωτεϊνών και για το λόγο αυτό προτιμάται ιδιαίτερα από τους καταναλωτές (Chandan & O'Rell, 2006; Chandan, 2017). Η αυξημένη αυτή αναλογία οφείλεται στο γεγονός ότι στο πήγμα εφαρμόζεται στράγγιση είτε παραδοσιακά σε υφασμάτινους σάκους, είτε με σύγχρονες τεχνολογίες όπως φυγοκέντρηση του πηγματος ή συμπύκνωση με υπερδιήθηση του γάλακτος πριν τη πήξη (Μάντης *et al.*, 2015). Ωστόσο η τελευταία πρακτική δεν βρίσκεται σε συμφωνία με τον ορισμό του στραγγιστού γιαουρτιού όπως αναφέρεται στον ΚΤΠ: «Ως «Στραγγιστό γιαούρτι» χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι μετά από αποστράγγιση μέρους του ορού μετά την πήξη και έχει κατ' ελάχιστο 5,6% πρωτεΐνες για το αγελαδινό ή γίδινο γάλα και 8% για το πρόβειο γάλα. Σε περίπτωση μιγμάτων διαφόρων ειδών γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υπολογίζεται με βάση την αναλογία των ειδών γάλακτος».

Η στράγγιση έχει ως σκοπό την αύξηση των στερεών συστατικών και βελτίωση της δομής (συνεκτικότητα) μέσω αποβολής μέρους της υδάτινης φάσης που αποτελεί τον ορό γιαουρτιού και περιέχει κυρίως λακτόζη, άλατα και ελάχιστες αζωτούχες ενώσεις (αμινοξέα και πεπτίδια). Κατά τη στράγγιση σε υφασμάτινους σάκους, το πήγμα εισάγεται σε αυτούς και ο ορός αποβάλλεται λόγω βαρύτητας ή με εφαρμογή πίεσης καθώς τοποθετούνται ο ένας πάνω στον άλλον σε ανοξεϊδωτες λεκάνες. Η στράγγιση διαρκεί 6-18 ώρες και πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία 0-5°C. Ύστερα, το περιεχόμενο των σάκων αδειάζει σε ειδικό ζυμωτήριο, αναδεύεται και τυποποιείται με προσθήκη παστεριωμένης κρέμας ή ορού αν απαιτείται. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου στράγγισης αποτελεί η αυξημένη χειρωνακτική εργασία και οι ελλιπείς συνθήκες υγιεινής. Για το λόγο αυτό εφαρμόζονται και εκσυγχρονισμένες μέθοδοι όπως στράγγιση με φυγοκέντρηση όπου ο ορός αποβάλλεται από το πήγμα σε ειδικούς διαχωριστήρες και υπερδιήθηση, όπου χρησιμοποιούνται ειδικές μεμβράνες που συγκρατούν το λίπος και τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να λαμβάνεται συμπύκνωμα πλούσιο σε στερεά συστατικά. Το τελικό προϊόν έχει λιποπεριεκτικότητα περίπου 10% (Chandan & O'Rell, 2006; Μάντης *et al.*, 2015).

1.5.2.4. Άλλα είδη γιαουρτιού

Άλλες κατηγορίες γιαουρτιού που υπάρχουν στην αγορά είναι: α) τα επιδόρπια γιαουρτιού που μπορούν να παρασκευαστούν εκτός από γάλα και από προϊόντα γάλακτος ή συστατικά του με επιπλέον πρόσθετα (γλυκαντικές ύλες, φρούτα, χυμοί κ.τ.λ.) β) γιαούρτι με προβιοτικά βακτήρια (π.χ. Activia) όπου εκτός από τη χαρακτηριστική καλλιέργεια του γιαουρτιού προστίθενται και άλλες καλλιέργειες με ευεργετική επίδραση στην υγεία του καταναλωτή (π.χ. είδη του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) γ) κατεψυγμένο γιαούρτι (frozen yoghurt)

δ) γιαούρτι με μειωμένη λακτόζη που παράγεται από γάλα όπου η λακτόζη έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση ε) γιαούρτι με μειωμένη λιποπεριεκτικότητα και στ) ρευστό γιαούρτι (αριάνι) (Chandan & O'Rell, 2006; Chandan, 2017). Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες, ανά τον κόσμο παράγονται συνεχώς καινούρια προϊόντα γιαουρτιού με διαφορετικά και ποικίλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

1.5.3. Χημική Σύσταση, Θρεπτική Αξία και Μεταβολές κατά τη Παρασκευή του Γιαουρτιού

Οι δύο βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του γιαουρτιού είναι η σύσταση της πρώτης ύλης και οι τεχνολογικές διεργασίες που εφαρμόζονται ανάλογα το είδος που πρόκειται να παραχθεί. Συνεπώς, παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του γάλακτος και κατ'επέκταση του γιαουρτιού είναι: α) γενετικοί (είδος, φυλή, ατομικότητα ζώου), β) φυσιολογικοί (στάδιο γαλακτικής περιόδου, ηλικία ζώου, κατάσταση υγείας μαστού) και γ) περιβαλλοντικοί (διατροφή, κλίμα/εποχή, μέθοδος άμελξης, μεταχείριση ζώων) ενώ διεργασίες όπως θέρμανση, ζύμωση, στράγγιση, προσθήκη διαφόρων συστατικών καθορίζουν επίσης τη περιεκτικότητα των συστατικών στο τελικό προϊόν (Deeth, & Tamime, 1981; Μοάτσου, 2009).

Στα κύρια συστατικά του γιαουρτιού συγκαταλέγονται το νερό, οι πρωτεΐνες, το λίπος (κυρίως κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα) και ο δισακχαρίτης λακτόζη (γλυκόζη και γαλακτόζη ενωμένα με β- 1,4 γλυκοζιτικό δεσμό), ενώ στα δευτερεύοντα οι βιταμίνες, τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Γενικότερα, το γιαούρτι αποτελεί ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας καθώς περιέχει μεγάλη συγκέντρωση πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων ενώ ταυτόχρονα αποτελεί πηγή ενέργειας, βιταμινών του συμπλέγματος Β (B₁, B₂, B₆, B₁₂), βιταμίνης Α, ασβεστίου και φωσφόρου (Shah, 2013; Chandan, 2017).

Οι πρωτεΐνες του γιαουρτιού αποτελούνται κυρίως από μερικώς υδρολυμένες και αποφωσφορυλιωμένες (λόγω θέρμανσης) καζεΐνες, μετουσιωμένες πρωτεΐνες του ορού (α-λακταλβουμίνη και β-γαλακτογλοβουλίνη) και ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια από τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων της οξυγαλακτικής καλλιέργειας με αποτέλεσμα να είναι πιο εύπεπτες από αυτές του γάλακτος (Deeth, & Tamime, 1981; Shah, 2013). Επιπλέον, από τη δράση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας ζυμώνεται μόνο το 20-30% της λακτόζης, ενώ το υπόλοιπο 60-70% μένει στο γιαούρτι με εξαίρεση τη περίπτωση της στράγγισης όπου μέρος της λακτόζης απομακρύνεται με τον ορό καθώς είναι υδατοδιαλυτή. Η ζύμωση της λακτόζης οδηγεί σε αύξηση στο γιαούρτι των μονοσακχαριτών που την αποτελούν: α) τη γλυκόζη που μεταβολίζεται προς γαλακτικό οξύ (1,2% στο γιαούρτι) και β) τη γαλακτόζη που πρακτικά δεν μεταβολίζεται περαιτέρω από τα βακτήρια του γιαουρτιού. Το γαλακτικό οξύ στο γιαούρτι βρίσκεται κατά 40-60% στη μορφή L(+) ενώ το υπόλοιπο είναι D(-) το οποίο αυξάνεται κατά

τη διατήρηση και δεν μεταβολίζεται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Για το λόγο αυτό, δεν ενδείκνυται η κατανάλωση γιαουρτιού σε ποσότητα πάνω από 1 kg ημερησίως (Deeth, & Tamime, 1981). Επίσης, από τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών (ζύμωση της λακτόζης ή αποδόμηση πρωτεϊνών και λιπιδίων) παράγονται σε μικρές ποσότητες ενώσεις όπως ακεταλδεΐδες, ακετοΐνη, διακετύλιο κ.τ.λ. οι οποίες όμως έχουν μεγάλη σημασία στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος του γιαουρτιού (Μάντης *et al.*, 2015; Μασούρας, 2021).

Τόσο η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων όσο και η θερμική επεξεργασία του γάλακτος είναι υπεύθυνες για αρκετές μεταβολές στη σύσταση και τη θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, η θέρμανση προκαλεί μείωση κατά 20-60% των βιταμινών B₁, B₆, B₁₂, C και φυλλικού οξέος προκαλώντας μικρή υποβάθμιση της θρεπτικής αξίας του προϊόντος (Deeth, & Tamime, 1981; Μάντης *et al.*, 2015; Μασούρας, 2021). Παρόλα αυτά, το γιαούρτι περιέχει αρκετές βιταμίνες και μέταλλα όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1.7**), μέρος των οποίων προέρχεται από τον μεταβολισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (π.χ. βιταμίνες του συμπλέγματος B) (Shah, 2013). Τα τελευταία συνιστούν το 1% της ξηρής ουσίας του γιαουρτιού και συμβάλουν επίσης στη θρεπτική αξία του καθώς οι βακτηριακές πρωτεΐνες είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα (Deeth, & Tamime, 1981).

Όσον αφορά τη λιποπεριεκτικότητα, το γιαούρτι περιέχει λίπος σε ποσοστό 3-4% ενώ στο γιαούρτι από πρόβειο γάλα φτάνει στο 7-8%. Τα τελευταία χρόνια με την στροφή των καταναλωτών προς πιο υγιεινές επιλογές υπάρχει τάση για παραγωγή γιαουρτιού από άπαχο γάλα. Το λίπος γενικότερα διαμορφώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού συμβάλλοντας στη συνεκτικότητα της δομής και στη πλούσια γεύση ενώ ταυτόχρονα παρέχει απαραίτητα λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένου του λινολεϊκού και λινολενικού οξέος, καθώς και των λιποδιαλυτών βιταμινών A, E, D και K (Shah, 2013).

Δεδομένου ότι στο εμπόριο υπάρχουν διάφορα είδη γιαουρτιού με διαφορετικές τεχνολογίες παρασκευής και συνεπώς διαφορετική σύσταση, στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 1.7**) παρατίθεται ενδεικτικά η σύσταση μερικών ειδών γιαουρτιού και επιδορπίων τύπου γιαουρτιού.

Πίνακας 1.7: Σύσταση διαφόρων ειδών γιαουρτιού ανά 100 g προϊόντος (Chandan, 2017).

| Συστατικά ανά 100 g προϊόντος | Πλήρες | Μειωμένης λιποπεριεκτικότητας | Άπαχο | Με φρούτα |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|-------|-----------|
| Νερό (%) | 81.30 | 83.56 | 85.10 | 76.81 |
| Ενέργεια (kcal) | 97 | 73 | 59 | 106 |
| Πρωτεΐνη (g) | 9.00 | 9.95 | 10.19 | 7.33 |
| Λίπος (g) | 5.00 | 1.92 | 0.39 | 3.00 |
| Κορεσμένα λιπαρά οξέα (g) | 2.395 | 1.230 | 0.117 | 1.599 |
| Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g) | 2.136 | 0.486 | 0.053 | 1.265 |
| Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (g) | 0.469 | 0.076 | 0.012 | 0.219 |
| Χοληστερόλη (mg) | 13 | 10 | 5 | 10 |
| Υδατάνθρακες (g) | 3.98 | 3.94 | 3.60 | 12.29 |
| Ασβέστιο (mg) | 100 | 115 | 110 | 100 |
| Σίδηρος (mg) | 0 | 0.04 | 0.07 | 0 |
| Μαγνήσιο (mg) | 11 | 11 | 11 | 10 |
| Φώσφορος (mg) | 135 | 137 | 135 | 109 |
| Κάλιο (mg) | 141 | 141 | 141 | 113 |
| Νάτριο (mg) | 35 | 34 | 36 | 37 |
| Ψευδάργυρος (mg) | 0.52 | 0.60 | 0.52 | 0.41 |
| Βιταμίνη C (mg) | 0 | 0,8 | 0 | 0 |
| Θειαμίνη (mg) | 0.023 | 0.044 | 0.023 | 0.046 |
| Ριβοφλαβίνη (mg) | 0.278 | 0.233 | 0.278 | 0.235 |
| Νιασίνη (mg) | 0.208 | 0.197 | 0.208 | 0.205 |
| Βιταμίνη B6 (mg) | 0.063 | 0.055 | 0.063 | 0.049 |
| Βιταμίνη B12 (μg) | 0.75 | 0.52 | 0.75 | 0.50 |
| Βιταμίνη A (μg) | 2 | 90 | 1 | 46 |
| Βιταμίνη E (mg) | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.07 |
| Βιταμίνη K (μg) | 0 | 0.2 | 0 | 0.3 |

1.5.4. Ευεργετικές ιδιότητες του γιαουρτιού στην υγεία

Πέρα από τη θρεπτική αξία που παρέχει το γιαούρτι, η κατανάλωσή του έχει συσχετιστεί με πολλαπλές ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό, που οφείλονται κυρίως στα συστατικά του. Στις πιθανές αυτές ιδιότητες συγκαταλέγονται αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, ανοσορυθμιστικές, ανιυπερτασικές, αντιχοληστερινικές, αντιφλεγμονώδης, βελτίωση της της γαστρεντερικής λειτουργίας, του μεταβολισμού της λακτόζης και της απορρόφησης ιχνοστοιχείων (Deeth, & Tamime, 1981; Fioramonti, *et al.*, 2003; Shah, 2013; Μάντης *et al.*, 2015; Politis & Theodorou, 2016). Οι περισσότερες από τις ιδιότητες αυτές έχουν αποδοθεί στη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων του γιαουρτιού και στα προϊόντα του μεταβολισμού τους.

Εκτός από την καλλιέργεια του γιαουρτιού, άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια που προστίθενται σε ορισμένα είδη και επιδόρπια γιαουρτιού (π.χ. διάφορα είδη του γένους *Bifidobacterium* και άλλοι λακτοβάκιλοι) αποτελούν προβιοτικούς μικροοργανισμούς που σύμφωνα με τον Οργανισμό Υγείας και Γεωργίας και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (FAO/WHO) ορίζονται ως «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή» (Fioramonti, *et al.*, 2003; Ανδρίτσος, 2015; Ali *et al.*, 2022). Τα βασικότερα από τα οφέλη αυτά συνοψίζονται παρακάτω:

- Το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τη ζύμωση της λακτόζης διεγείρει την κινητικότητα του εντέρου, αυξάνει την πεπτικότητα των καζεϊνών και του λίπους και ενισχύει την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο (Shah, 2013; Μάντης *et al.*, 2015).
- Παρουσία αντιμικροβιακής δράσης για ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων και ειδικότερα εκείνων που προκαλούν εντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*). Η δράση αυτή οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που προκαλεί πτώση του pH και δρα ως αντιμικροβιακή ουσία, στο μικροβιακό ανταγωνισμό ή την παραγωγή H₂O₂ βακτηριοσινών από την οξυγαλακτική καλλιέργεια (Deeth, & Tamime, 1981; Fioramonti, *et al.*, 2003; Shah, 2013; Ανδρίτσος, 2015).
- Ενίσχυση της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου που έχει ιδιαίτερη σημασία ύστερα από τη χορήγηση αντιβιοτικών. Παρά το γεγονός ότι ο *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* παρουσιάζει ανθεκτικότητα, οι συνθήκες που επικρατούν στο έντερο δεν επιτρέπουν την αποίκισή του σε αυτό. Έτσι, το γιαούρτι συμβάλλει έμμεσα στον πολλαπλασιασμό των γαλακτοβακκίλων του εντέρου (*Lb. acidophilus*, *Lb. bifidus*) και επαναφέρει την ισορροπία στη μικροβιακή χλωρίδα (Shah, 2013; Ανδρίτσος, 2015; Μάντης *et al.*, 2015).
- Συμβολή στη μείωση της χοληστερόλης και κυρίως της χαμηλής πυκνότητας (LDL, low density lipoprotein) χοληστερόλης στο αίμα, η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στα τοιχώματα των αρτηριών και κατά συνέπεια την εκδήλωση καρδιαγγειακών προβλημάτων (Ανδρίτσος, 2015). Σύμφωνα με τους Deeth, & Tamime, (1981) και Shah (2013) το ασβέστιο, το οροτικό οξύ, η λακτόζη και οι καζεΐνες έχουν προταθεί ως υποχοληστερολαιμικές ουσίες ενώ ταυτόχρονα υποστηρίζεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ικανά να μειώσουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα (Gilliland, 2001; Schmid *et al.*, 2006; Ανδρίτσος, 2015). Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα βακτήρια δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο φαίνεται πως οι μεταβολίτες τους παράγουν το υδροξυμεθυλ-γλουταρικό το οποίο παρεμποδίζει τη σύνθεση της χοληστερόλης στο αίμα (Deeth, & Tamime, 1981; Shah, 2013).

- Μείωση του κινδύνου εμφάνισης οστεοπόρωσης λόγω κάλυψης των αναγκών του οργανισμού σε ασβέστιο (Deeth, & Tamime, 1981; Shah, 2013).
- Διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων τα οποία καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς με φαγοκύτωση, μέσω συμβολής στην παραγωγή κυτοκινών (ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες) και στην έκκριση ανοσογλοβουλινών (Shah, 2013; Ανδρίτσος, 2015).
- Μελέτες υποδεικνύουν τη συσχέτιση μεταξύ χαμηλής συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του παχέως εντέρου και της κατανάλωσης ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν λακτοβάκιλους ή *Bifidobacteria* (Fioramonti, *et al.*, 2003; Kanekanian, 2014; Ανδρίτσος, 2015). Σύμφωνα με τον Shah, (2013), μελέτες σε ζώα έχουν δείξει πως η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.
- Το γιαούρτι είναι γενικότερα πιο εύπεπτο από το γάλα απ' το οποίο παράγεται. Η οξυγαλακτική καλλιέργεια έχει ζυμώσει μέρος της λακτόζης, ενώ παράλληλα φέρει το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση, τα χαμηλά επίπεδα του οποίου στο έντερο ορισμένων ατόμων προκαλούν δυσανεξία στη λακτόζη με συμπτώματα όπως φούσκωμα, κοιλιακοί πόνοι και εντερικές κενώσεις. Έτσι το γαλακτοκομικό αυτό προϊόν είναι κατάλληλο για τα άτομα που πάσχουν από το συγκεκριμένο πρόβλημα και καταναλώνεται για την κάλυψη των αναγκών τους σε ασβέστιο που δεν μπορούν να προσλάβουν από το γάλα (Deeth, & Tamime, 1981; Ανδρίτσος, 2015).
- Τέλος, η πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλακτος (κυρίως α_{s1}-, β- και κ-καζεΐνες και πρωτεΐνες του ορού) με έναν από τους παρακάτω τρόπους: 1) γαστρεντερική πέψη του γάλακτος 2) ζύμωση του γάλακτος από πρωτεολυτικές εναρκτήριες καλλιέργειες και 3) υδρόλυση από πρωτεολυτικά ένζυμα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πεπτιδίων με πολυάριθμες ευεργετικές ιδιότητες σε διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού (αντιμικροβιακές, αντιυπερτασικές, αντιθρομβωτικές, ανοσορρυθμιστικές, υποχοληστερολαιμικές, οπιοειδείς, αντιοξειδωτικές και μέταλλοδεσμευτικές) (Chobert *et al.*, 2005; Korhonen & Pihlanto, 2006; Korhonen & Pihlanto, 2007; Haque *et al.*, 2009; Kanekanian, 2014; Αργύρη, 2015; Politis & Theodorou, 2016; Theodorou & Politis, 2016; Ali *et al.*, 2022). Τέτοια βιολειτουργικά πεπτιδία έχουν εντοπισθεί και σε γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης όπως το γιαούρτι στο οποίο πιθανόν να έχουν προέλθει 1) από τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων της οξυγαλακτικής καλλιέργειας τόσο κατά την παραγωγή όσο και κατά την αποθήκευσή του, 2) από ενδογενή ένζυμα του γάλακτος (π.χ. πλασμίνη) κατά τη διατήρησή του πριν χρησιμοποιηθεί για τη παραγωγή γιαουρτιού ή 3) από

πρωτεολυτικά ένζυμα της φυσικής μικροχλωρίδας του γάλακτος που έχουν επιβιώσει της θερμικής επεξεργασίας και έχουν περάσει στο γιαούρτι (Chobert *et al.*, 2005; Korhonen & Pihlanto, 2006; Donkor *et al.*, 2007; Papadimitriou *et al.*, 2007; Haque *et al.*, 2009; Politis & Theodorou, 2016; Theodorou & Politis, 2016; Taha *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2022). Από τα πεπτίδια αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχουν μελετηθεί εκτενέστερα εκείνα που εκδηλώνουν αντιυπερτασικές (παρεμπόδιση ACE στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης) και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση έδειξε πως πεπτίδια με τις συγκεκριμένες ιδιότητες έχουν βρεθεί στο γιαούρτι καθώς και σε προϊόντα ζύμωσης του γάλακτος όμοια του γιαουρτιού που παράγονται με χρήση διαφόρων οξυγαλακτικών και προβιοτικών μικροοργανισμών και από διάφορα είδη γάλακτος (Yamamoto *et al.*, 1999; Chobert *et al.*, 2005; Hernández-Ledesma, 2005; Korhonen & Pihlanto, 2006; Donkor *et al.*, 2007; Papadimitriou *et al.*, 2007; Politis & Theodorou, 2016; Theodorou & Politis, 2016; Sultan *et al.*, 2017). Συγκεκριμένα, οι Yamamoto *et al.*, (1999) εντόπισαν το διπεπτίδιο Tyr-Pro (από α_1 - β - και κ -καζεΐνη), με ισχυρά ACE-παρεμποδιστική δράση, σε προϊόν τύπου γιαουρτιού που ζυμώθηκε με το στέλεχος *Lb. helveticus* CPN4. Ένα επιπλέον πεπτίδιο με όμοια δράση και αλληλουχία Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly, εντόπισαν οι Ashar & Chand (2004) από β -καζεΐνη γάλακτος που ζυμώθηκε με *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Άλλα πεπτίδια με ACE-παρεμποδιστική δράση που βρέθηκαν στο γιαούρτι είναι το θραύσμα της β -καζεΐνης, f(114-121) καθώς και το πεπτίδιο RPKHPIKH f(1-8) από πρόβειο γάλα που ζυμώθηκε με *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Papadimitriou *et al.*, 2007), τα τριπεπτίδια Val-Pro-Pro (VPP) και Ile-Pro-Pro (IPP) προερχόμενα από α_1 - β - και κ -καζεΐνη (Donkor *et al.*, 2007) και προϊόντα υδρόλυσης β -γαλακτογλοβουλίνης γιαουρτιού από τρυψίνη (Chobert *et al.*, 2005). Η HPLC ανάλυση των Georgalaki *et al.*, (2017) σε γάλατα διαφορετικής ζωικής προέλευσης (αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο) που ζυμώθηκαν από καλλιέργειες γιαουρτιού (*S. thermophilus* και *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*) επίσης οδήγησε στον εντοπισμό πεπτιδικών κλασμάτων με ACE-παρεμποδιστική δράση. Πρωτεϊνικά θραύσματα με αντίστοιχη δράση εντοπίστηκαν από τη δράση του *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* στην α_1 -καζεΐνη (RPKHPIKHQGL) (Minervini *et al.*, 2003), στη β -καζεΐνη (YQEVPLGPPVRGPPILV) (Pihlanto-Leppälä & Korhonen, 1998) και κ -καζεΐνη (EQNQEQRICCEKDER) (Gómez-Ruiz, & Recio, 2007). Επιπλέον, πεπτιδικά θραύσματα με ACE-παρεμποδιστική δράση που έχουν βρεθεί αποκλειστικά από πρωτεΐνες γιαουρτιού με επιπρόσθετες καλλιέργειες εκτός από αυτές του γιαουρτιού είναι τα: f(24-32) προερχόμενο από α_1 -καζεΐνη (Ong & Shah, 2008), f(199-209) (Ha, Chang, & Jo, 2015), f(108-113) (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000), από β -καζεΐνη και f(81-89) από α_2 -καζεΐνη (Murray & Fitzgerald 2007).

Εκτός από πεπτιδία με αντιυπερτασική δράση στο γιαούρτι έχουν αναφερθεί και πεπτιδία με αντιφλεγμονώδη (Leu-Leu-Tyr και Pro-Gly-Pro-Ileu-Pro-Asp) (Politis & Theodorou, 2016; Theodorou & Politis, 2016) και ανοσορρυθμιστική ιδιότητα π.χ. η αλληλουχία GPVRGPFPII με ανοσορρυθμιστική δράση (Coste *et al.*, 1992). Αξίζει να σημειωθεί πως η δράση των πεπτιδίων αυτών μεταβάλλεται κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Donkor *et al.*, 2007; Papadimitriou *et al.*, 2007; Moschoroulou *et al.*, 2018).

Συνεπώς, η παρουσία αυτών των βιολειτουργικών συστατικών σε συνδυασμό με τις ευεργετικές δράσεις των εναρκτήριων και προβιοτικών καλλιεργείων, καθιστούν το γιαούρτι ένα εξαιρετικό λειτουργικό τρόφιμο το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί στη παραγωγή βιολειτουργικών συστατικών και καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων για την κάλυψη των αναγκών των καταναλωτών για τρόφιμα με ιδιότητες που προάγουν την υγεία (Papadimitriou *et al.*, 2007; Kanekianan, 2014; Ali *et al.*, 2022).

1.5.5. Καινοτόμο προϊόν γιαουρτιού εμπλουτισμένο με μικροφύκη

Η ικανότητα του γιαουρτιού να παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος συνδυαστικά με τις ευεργετικές ιδιότητες των ζώντων μικροοργανισμών που διαθέτει, έχει καταστήσει το προϊόν αυτό αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής (Sfakianakis & Tzia, 2014; German, 2014; Papadimitriou *et al.*, 2007; Barkallah *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2022; Hernández *et al.*, 2022). Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια παρά την υψηλή ζήτηση της αγοράς σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης, η κατανάλωση του γιαουρτιού και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης (π.χ. κεφίρ, αριάνι) έχει κλιμακωθεί (Sfakianakis & Tzia, 2014; Papadimitriou *et al.*, 2007; Barkallah *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2022). Επιπλέον, η ολοένα αυξανόμενη γνώση της επίδρασης που ασκεί η διατροφή στην υγεία, η τεχνολογική πρόοδος, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής του πληθυσμού, οι φτωχές διατροφικές συνήθειες καθώς και οι κοινωνικοοικονομικές τάσεις, έχουν διευρύνει την ανάγκη των καταναλωτών για καινοτόμα λειτουργικά τρόφιμα, με βελτιωμένη φυσική σύσταση και πολλαπλά οφέλη για την υγεία (Papadimitriou *et al.*, 2007; El-Fattah *et al.*, 2018; Suzery *et al.*, 2018; Gumus & Gharibzahedi, 2021; Pan-utai *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Hernández *et al.*, 2022). Το γιαούρτι, όπως έχει αποδειχθεί, μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη τέτοιων τροφίμων (Papadimitriou *et al.*, 2007; Kanekianan, 2014; Robertson *et al.*, 2016; El-Fattah *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022). Έτσι, επιστήμονες της διατροφής και πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην ενσωμάτωση φυσικών και ασφαλών συστατικών με υψηλή θρεπτική αξία και βιολειτουργικές ιδιότητες σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (Prakash & Kumari, 2011; Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Hernández *et al.*, 2022). Τα μικροφύκη αποτελούν

τέτοια συστατικά καθώς διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και άλλα θρεπτικά συστατικά και είναι πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Lafarga, 2019a; Pan-utai *et al.*, 2021; Hernández *et al.*, 2022). Η προσθήκη των μικροφυκών έχει εφαρμοστεί σε διάφορα τρόφιμα (μπάρες δημητριακών, σοκολάτες, ζυμαρικά, ενεργειακά ποτά) είτε ως χρωστική ουσία είτε για τη βελτίωση των διατροφικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (Lafarga, 2019a; Hernández *et al.*, 2022).

Σύμφωνα με μελέτες, τα πιο ευρέως αναγνωρισμένα ως κατάλληλα για ενσωμάτωση σε γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, είναι τα μικροφύκη *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris* (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018). Ο εμπλουτισμός του γιαουρτιού με τα συγκεκριμένα είδη μικροφυκών ή τα συστατικά τους, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υβριδικού προϊόντος που αθρίζει τις ευεργετικές ιδιότητες που παρέχουν τα δύο τρόφιμα στην υγεία, δίνει προστιθέμενη θρεπτική αξία στο τελικό προϊόν και αυξάνει τη βιολειτουργικότητά του (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021; Hernández *et al.*, 2022). Πιο διαδεδομένη είναι η χρήση του μικροφύκου *Spirulina platensis*, διότι πέρα από τη θρεπτική της αξία και τα πολλαπλά οφέλη στην υγεία είναι πιο εύπεπτη, σε σχέση με τη *Chlorella* καθώς δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα, ενώ ταυτόχρονα για τον λόγο αυτό επιτυγχάνεται πιο εύκολα η εκχύλιση των συστατικών της (Beheshtipour *et al.*, 2012; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021; Giannoglou *et al.*, 2022). Η συγκριτική μελέτη των Beheshtipour *et al.* (2012) για την επίδραση των δύο αυτών μικροφυκών στις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και μετά το πέρας της, έδειξε ότι οι χειρισμοί του γιαουρτιού με *S. platensis* είχαν ως αποτέλεσμα ταχύτερη αύξηση οξύτητας, μεγαλύτερη διάρκεια επώασης και υψηλότερη τελική ογκομετρούμενη οξύτητα.

Επιπρόσθετα, σε ένα προϊόν όπως το γιαούρτι, η ζωτικότητα και η αφθονία των εναρκτηρίων και προβιοτικών καλλιεργειών του, συνιστούν σημαντική παράμετρο για την εκδήλωση των θετικών επιδράσεων στην υγεία (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013). Ωστόσο, οι παράμετροι αυτοί συνήθως επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες (π.χ. υψηλή ογκομετρούμενη οξύτητα και δυναμικό οξειδοαναγωγής, μοριακό οξυγόνο, αντιμικροβιακοί παράγοντες, πρόσθετα κ.α.) που συχνά προκαλούν απώλεια στη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή κατά τη περίοδο αποθήκευσης (Beheshtipour *et al.*, 2013). Φαίνεται ότι η συνύπαρξη των μικροφυκών με τα προβιοτικά μπορεί να τονώσει την ανάπτυξη και να αυξήσει τη βιωσιμότητα των τελευταίων, τόσο στο προϊόν όσο και στον γαστρεντερικό σωλήνα μετά την κατανάλωσή του. Το γεγονός αυτό,

ωφείλεται στον αλκαλικό χαρακτήρα των μικροφυκών, στα θρεπτικά συστατικά που παρέχουν στους μικροοργανισμούς (βιταμίνες, μέταλλα, σάκχαρα κ.τ.λ.) αλλά και στη παρουσία ενώσεων όπως αδερίνη, υποξανθίνη και ελεύθερα αμινοξέα (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017).

Άλλο ένα πλεονέκτημα της προσθήκης μικροφυκών ή συστατικών τους (π.χ. πρωτεϊνών) στο γιαούρτι, είναι ο εμπλουτισμός με επιπλέον θρεπτικά συστατικά που είναι φυσικής προέλευσης και ασφαλή έναντι συνθετικών που συχνά χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων με σκοπό να αυξήσουν τη θρεπτική αξία, να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ή να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Lafarga, 2019a; Pan-utai *et al.*, 2021). Επίσης, η αντικατάσταση ορισμένων συστατικών του γιαουρτιού, όπως το ζωικό λίπος πλούσιο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, με φυτικά ακόρεστα λίπη των μικροφυκών (πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα) οδηγεί στην ανάπτυξη μιας πιο υγιεινής εκδοχής του προϊόντος, δεδομένου ότι τα κορεσμένα λίπη έχουν συσχετιστεί με πολλά προβλήματα υγείας (π.χ. υπέρταση και καρδιακά προβλήματα) (Robertson *et al.*, 2016; Gumus & Gharibzahedi, 2021). Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί πως το εμπλουτισμένο γιαούρτι αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα τέτοιων βιοενεργών συστατικών (Gumus & Gharibzahedi, 2021).

Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί πως τα μικροφύκη πιθανόν να προκαλέσουν ελαττώματα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού (χρώμα, υφή, άρωμα, γεύση) και να μειώσουν την αποδοχή από τους καταναλωτές καθώς είναι δυσδιάλυτα, πλούσια σε χρωστικές και διαθέτουν ήπια γεύση ψαριού (η οποία συνήθως μειώνεται με την επεξεργασία) (Beheshtipour *et al.*, 2013; Robertson *et al.*, 2016; Lafarga, 2019a; Hernández *et al.*, 2022). Όσον αφορά τη δομή, ωστόσο, η περιεκτικότητα των μικροφυκών σε διαιτητικές ίνες και πρωτεΐνες, έχει ως συνέπεια αυτά να δρουν ως σταθεροποιητές, να αυξάνουν το ιξώδες και να μειώνουν το φαινόμενο της συναίρεσης που είναι ανεπιθύμητο στα γιαούρτια (Barkallah *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2022).

Τα φυσικοχημικά, μηχανικά και οργανοληπτικά αυτά χαρακτηριστικά του προϊόντος επηρεάζονται συνήθως από την μορφή με την οποία προστίθενται τα μικροφύκη (φρέσκα ή αφυδατωμένα), τη συγκέντρωση στο τελικό προϊόν και τον τρόπο προσθήκης της βιομάζας των μικροφυκών ή εκχυλίσματος συστατικών τους (Beheshtipour *et al.*, 2012; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021). Στις περισσότερες μελέτες έχουν εντοπισθεί κυρίως δύο τρόποι προσθήκης: α) προσθήκη στο γάλα πριν τη διαδικασία ζύμωσης (Beheshtipour *et al.*, 2012; Barkallah *et al.*, 2017), β) προσθήκη στο τελικό προϊόν μετά τη ζύμωση και κυρίως σε αφυδατωμένη μορφή (Robertson *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2019) που επιδρούν στις φυσικοχημικές, οργανοληπτικές και λειτουργικές ιδιότητες του τελικού

προϊόντος (Hernández *et al.*, 2022). Επίπλέον, έχει εξεταστεί η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων-ποσοστών μικροφυκών στη θρεπτική αξία και στις λειτουργικές ιδιότητες του προϊόντος (Beheshtipour *et al.*, 2012; Barkallah *et al.*, 2017; Suzery *et al.*, 2018; Pan-utai *et al.*, 2021).

Γενικότερα, η ανάπτυξη τέτοιων καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων καθώς και η επίδρασή τους στην υγεία του καταναλωτή απασχολεί όλο και περισσότερο τις βιομηχανίες, καθώς και την επιστημονική κοινότητα του κλάδου των τροφίμων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι βιολειτουργικές ιδιότητες, και συγκεκριμένα οι ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές, καινοτόμων προϊόντων επιδόρπιου γιαουρτιού με προσθήκη βιομάζας του μικροφύκου *Arthrospira (Spirulina) platensis* εμπλουσμένη με σίδηρο (Fe), καθώς και επιδορπίων γιαουρτού εμπλουτισμένα με εκχυλίσματα συστατικών από το ίδιο είδος μικροφύκου, ύστερα από *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης τους, όπως περιγράφεται σε επόμενα κεφάλαια.

Κεφάλαιο 2^ο

Σκοπός της Μελέτης

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην *in vitro* μελέτη των βιολειτουργικών ιδιοτήτων, και συγκεκριμένα των ανοσορυθμιστικών και αντιυπερτασικών ιδιοτήτων, των πεπτιδικών κλασμάτων που απομονώθηκαν ύστερα από προσομοίωση (*in vitro*) της πέψης δύο ειδών μικροφυκών, της *Arthrospira (Spirulina) platensis* και *Chlorella vulgaris*, καθώς και των καινοτόμων προϊόντων επιδόρπιων γιαουρτιού με προσθήκη συστατικών της *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Επιπλέον, σκοπό των πειραματικών διεργασιών αποτέλεσε και η αξιολόγηση της επίδρασης του εμπλουτισμού των δύο ειδών μικροφυκών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (61 mg Fe /L και 183 mg Fe /L) στη διαλυτότητα-βιοδιαθεσιμότητα του Fe καθώς και στις βιολειτουργικές ιδιότητες των μικροφυκών.

Η μελέτη αυτή, μέσω της τεκμηρίωσης των βιολειτουργικών ιδιοτήτων τόσο των μικροφυκών, όσο και των καινοτόμων προϊόντων γιαουρτιού, αναμένεται να προσδώσει προστιθέμενη αξία στα μικροφύκη και να αναδείξει τα οφέλη της χρήσης τους σε προϊόντα τροφίμων. Ταυτόχρονα, αναμένεται να συμβάλει μακροπρόθεσμα στην ανάπτυξη και διάθεση στην αγορά ενός ποιοτικού προϊόντος επιδόρπιου γιαουρτιού με θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, καλύπτοντας έτσι τις ολοένα αυξανόμενες τα τελευταία χρόνια ανάγκες των καταναλωτών για βιολειτουργικά τρόφιμα που συμμετέχουν στην προάσπιση της υγείας και παρέχουν επιπλέον οφέλη από τα αναμενόμενα.

2.1. Εισαγωγή στην Πειραματική Διαδικασία

Για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων αναλύθηκαν τρία δείγματα για κάθε μικροφύκος σε μορφή σκόνης, με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (Control, 61 mg/L Fe, 183 mg/L Fe) και 3 περιπτώσεις προϊόντων επιδόρπιου γιαουρτιού. Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν πρώτα σε *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης για την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων από τις πρωτεΐνες τους και έπειτα απομονώθηκαν τα πεπτιδικά κλάσματα. Αρχικά μελετήθηκαν ως προς τις ανοσορυθμιστικές τους ιδιότητες σε καρκινική κυτταρική σειρά μονοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης (THP-1) ύστερα από την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα και διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), με σκοπό τη διαμόρφωση συνθηκών φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η επίδραση της επώασης των κυττάρων παρουσία ορισμένης συγκέντρωσης πεπτιδικών κλασμάτων, στη σχετική έκφραση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης (IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-8, IL-12 β , TNF- α , TNF-rec, MMP9, ICAM-1, MyD88, MCP-1, LST1, TGF- β) του ενζύμου

COX-2 και γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταγραφική απόκριση της πρώτης ομάδας γονιδίων (NF-κB, NF-κB-Rela, STAT1, STAT2, IRF5, TLR2 και TLR4), με την τεχνική qPCR. Σε συνέχεια του πειράματος μελετήθηκαν οι αντιυπερτασικές ιδιότητες των δειγμάτων, μέσω προσδιορισμού της ανασταλτικής τους δράσης έναντι του ενζύμου ACE (Angiotensin-Converting Enzyme). Η δραστηριότητα του ACE μετρήθηκε (παρουσία των πεπτιδίων) ως ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm κατά τα πρώτα 30 λεπτά της καταλυόμενης από το ACE υδρόλυσης του FA-PGG (furanacroyl-Phe-Glu-Glu).

Τέλος, η διαλυτότητα του σιδήρου (Fe) στα δείγματα μικροφυκών προσδιορίστηκε από τη μέτρηση της συγκέντρωσης δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) σε αυτά, με τη μέθοδο της φερροζίνης (ferrozine assay).

Κεφάλαιο 3^ο

Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Συλλογή και Προετοιμασία Δειγμάτων

3.1.1. Δείγματα και Δειγματοληψία

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρασκευάστηκαν και παραχωρήθηκαν ευγενώς από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων «ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ» στα πλαίσια του ερευνητικού έργου με τίτλο: «Παραγωγή καινοτόμου προϊόντος επιδορπίου γιαουρτιού με χρήση μικροφυκών» ή «FicoYog».

3.1.1.1. Δείγματα μικροφυκών

Μελετήθηκαν δύο είδη μικροφυκών: *Arthrospira (Spirulina) platensis* και *Chlorella vulgaris* σε λυοφιλωμένη μορφή (μορφή σκόνης) (**Εικόνα 3.1**), καθώς επίσης και τα ίδια μικροφύκη εμπλουτισμένα το καθένα με σίδηρο (Fe), σε συγκεντρώσεις 61 mg Fe/ L και 183 mg Fe/ L. Ο εμπλουτισμός πραγματοποιήθηκε με ανάπτυξη των μικροφυκών σε μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με σίδηρο όπως περιγράφεται από τους Kougia *et al.*, (2023). Η διατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.1**) παρουσιάζονται αναλυτικά τα δείγματα με τους συμβολισμούς τους και τα ποσοστά της πρωτεϊνικής τους περιεκτικότητας.



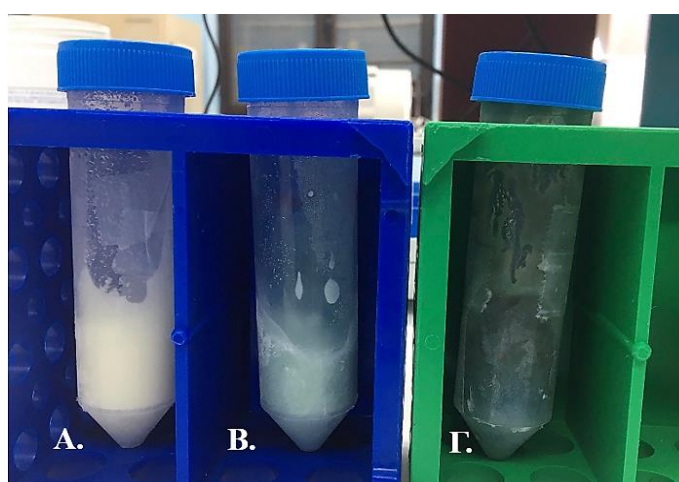
Εικόνα 3.1: Δείγματα μικροφυκών σε λυοφιλωμένη μορφή: *Arthrospira (Spirulina) platensis* (αριστερά) και *Chlorella vulgaris* (δεξιά).

Πίνακας 3.1: Πληροφορίες των υπό μελέτη δειγμάτων μικροφυκών.

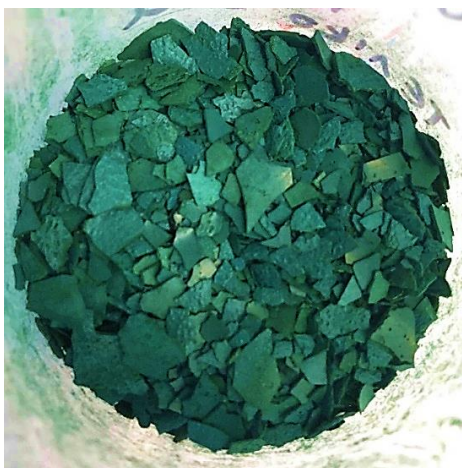
| Δείγματα Μικροφυκών | | | |
|--|---------------------------|-------------|--------------|
| Είδος μικροφύκους | Εμπλουτισμός σιδήρου (Fe) | Συμβολισμός | Πρωτεΐνη (%) |
| <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> | Control | S.C. | 62,5 |
| | 61 mg Fe/L | S.61 | 55,2 |
| | 183 mg Fe/L | S.183 | 46 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Control | C.C. | 38,5 |
| | 61 mg Fe/L | C.61 | 34,5 |
| | 183 mg Fe/L | C.183 | 33,1 |

3.1.1.2. Δείγματα επιδορπίων γιαουρτιού

Οι περιπτώσεις επιδορπίων γιαουρτιού που μελετήθηκαν (**Εικόνα 3.2**) είναι οι ακόλουθες: α) επιδόρπιο γιαουρτιού με προσθήκη βιομάζας του μικροφύκους *Arthrospira (Spirulina) platensis* εμπλουσμένη με σίδηρο (Fe) (1 mg Fe/100g γιαουρτιού), β) επιδόρπιο γιαουρτιού εμπλουτισμένο με εκχύλισμα πρωτεϊνών του ίδιου μικροφύκους, και γ) επιδόρπιο γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση (15%) του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά (έλαια) του μικροφύκους. Επιπλέον, ως συγκριτικοί μάρτυρες των παραπάνω δειγμάτων, μελετήθηκαν δ) το σκέτο γιαούρτι, ε) η βιομάζα της *Spirulina platensis* (λυοφιλωμένη) (**Εικόνα 3.3**) και στ) το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του μικροφύκους (σε σκόνη) που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των αντίστοιχων δειγμάτων.



Εικόνα 3.2: Δείγματα (επιδορπίων) γιαουρτιού: (Α.) Σκέτο γιαούρτι από πρόβειο γάλα, (Β.) Επιδόρπιο γιαουρτιού εμπλουτισμένο με εκχύλισμα πρωτεϊνών της *Spirulina platensis* και (Γ.) Επιδόρπιο γιαουρτιού με προσθήκη βιομάζας της *Spirulina platensis*.



Εικόνα 3.3: Βιομάζα της *Spirulina platensis* σε λυοφιλωμένη μορφή.

Για την παρασκευή του γιαουρτιού (κατηγορία: βιομηχανικό) που αποτέλεσε τη βάση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε πρόβειο γάλα (2% λιπαρά) και γιαούρτι του εμπορίου (1,5% λιπαρά) ως καλλιέργεια. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών του μικροφύκους πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή σε αυτό υπερυψηλής πίεσης (300 MPa για 10 λεπτά, pH = 7,1), με αποτέλεσμα την καταστροφή των νημάτων της σπιρουλίνας και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών της. Μέσο εκχύλισης αποτέλεσε το νερό. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε ως βέλτιστη για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και c-φυκοκυανίνης της υγρής βιομάζας του μικροφύκους, λόγω υψηλών αποδόσεων και καθαρότητας του εκχυλίσματος, καθώς και λόγω λήψης μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών με ηπιότερες διαμορφωτικές αλλαγές (Giannoglou *et al.*, 2022; Giannoglou *et al.*, 2023). Η προσθήκη των συστατικών του μικροφύκους κατά την παραγωγική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο γάλα πριν το στάδιο επώασης και ζύμωσης.

Για καθεμία από τις ανωτέρω περιπτώσεις δειγμάτων (α, β, γ και δ) λήφθηκαν τρία δείγματα με διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης υπό ψύξη (στους 4 °C) από την ημέρα παραγωγής τους: $t_0 = 0$, $t_1 = 14$ και $t_2 = 28$ ημέρες. Τα δείγματα μετά τη λήψη τους διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη. Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 3.2**) παρουσιάζονται αναλυτικά τα δείγματα και οι πληροφορίες τους.

Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη δειγμάτων επιδορπίων γιαουρτιού.

| Δείγματα Επιδορπίων Γιαουρτιού & Μάρτυρες | | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Δείγματα | Συμβολισμός Δειγμάτων | Χρόνος αποθήκευσης στους 4 °C (t) | Πρωτεΐνη (%) |
| Γιαούρτι Σκέτο | Y.C. (Yoghurt Control) | t0 | 5,17 |
| | | t1 | |
| | | t2 | |
| Επιδόρπιο Γιαουρτιού με Βιομάζα <i>Spirulina platensis</i> | Y.S.B. (Yoghurt Spirulina Biomass) | t0 | 5,45 |
| | | t1 | |
| | | t2 | |
| Επιδόρπιο Γιαουρτιού με Εκχύλισμα Πρωτεϊνών της <i>Spirulina platensis</i> | Y.S.E. (Yoghurt Spirulina Extract) | t0 | 5,57 |
| | | t1 | |
| | | t2 | |
| Επιδόρπιο Γιαουρτιού με Λιπαρά Συστατικά από <i>Spirulina platensis</i> | Y.L. (Yoghurt Lipids) | t0 | 6 |
| | | t1 | |
| | | t2 | |
| Βιομάζα <i>Spirulina platensis</i> (σκόνη) | P.S.B. (Pwoder Spirulina Biomass) | - | 60,79 |
| Εκχύλισμα Πρωτεΐνης (σκόνη) | P.S.E. (Pwoder Spirulina Extract) | - | 81,35 |

Και οι δύο κατηγορίες δειγμάτων υποβλήθηκαν στις ίδιες πειραματικές διεργασίες για τη λήψη των τελικών αποτελεσμάτων, με ορισμένες διαφοροποιήσεις οι οποίες αναφέρονται στην αναλυτική περιγραφή της κάθε πειραματικής πορείας.

3.1.2. *In vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης των δειγμάτων

3.1.2.1. Σκοπός

Για την υδρόλυση των πρωτεϊνών και την απελευθέρωση βιολειτουργικών συστατικών από τα δείγματα, εφαρμόστηκε σε αυτά ένα στατικό μοντέλο *in vitro* προσομοίωσης της γαστρεντερικής πέψης τους. Σκοπός της διαδικασίας ήταν να εφαρμοστούν στα δείγματα συνθήκες όμοιες με εκείνες που λαμβάνουν χώρα στην φυσιολογική πέψη ενός τροφίμου εντός του ανθρώπινου οργανισμού, κατά την από του στόματος κατανάλωση. Η πειραματική πορεία βασίστηκε στο πρωτόκλλο του στατικού μοντέλου INFOGEST, που περιέγραψαν οι Brodtkorb

et al. (2019) με ορισμένες τροποποιήσεις. Το μοντέλο αυτό αποτελείται από την προετοιμασία του πειράματος, τις τρεις φάσεις της πέψης (στοματική, γαστρική και εντερική) και το χειρισμό των τελικών προϊόντων της πέψης για περαιτέρω ανάλυση (δείγματα μετά την πέψη).

3.1.2.2. Προετοιμασία πειράματος

Αρχικά για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου απαραίτητος ήταν ο προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (πεψίνη, παγκρεατίνη) καθώς και της συγκέντρωσης των χολικών αλάτων. Τα ένζυμα πεψίνη και παγκρεατίνη αποτελούν τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στη γαστρεντερική πέψη (FAO/WHO, 2001; Markell *et al.*, 2017). Η συγκέντρωση των χολικών αλάτων υπολογίστηκε με βάση το σκεύασμα (0,696 mmol/gr) για την επίτευξη 10 mM στο τελικό διάλυμα (Bile extract porcine, Sigma- Aldrich, B8631). Έπειτα, παρασκευάστηκε μια σειρά από διαλύματα αλάτων, που αποτέλεσαν τη βάση για τα διαλύματα προσομοίωσης σιελογόνου υγρού (Simulated Salivary Fluid, SSF), γαστρικού υγρού (Simulated Gastric Fluid, SGF) και εντερικού υγρού (Simulated Intestinal Fluid, SIF). Τα τελευταία προστέθηκαν στην στοματική, γαστρική και εντερική φάση της πέψης αντίστοιχα, με στόχο την διαμόρφωση των κατάλληλων συνθηκών. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:

3.1.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων αλάτων και διαλυμάτων SSF, SGF και SIF

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- KCl (Sigma-Aldrich 31248)
- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich P5655)
- NaHCO_3 (Sigma-Aldrich S5761)
- NaCl (Sigma-Aldrich 746398)
- $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (Sigma-Aldrich M2393)
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Sigma-Aldrich 207861)
- $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Sigma-Aldrich 31307)
- HCl 6 M
- Δις απεσταγμένο νερό Milli Q

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Σωλήνες τύπου falcon 50 mL
- Δοχεία Duran 500 mL, 1000 mL
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 500 mL, 1000 mL
- Σιφόνια 10 mL και 25 mL
- Χωνί
- Σπάτουλα

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius TE214S)
- Μαγνητικός αναδευτήρας- μαγνητάκια (Stuart- Scientific)
- Αναρροφητήρας (accu-jetpro)
- Σωλήνες τύπου Eppendorf 2 mL
- Γυάλινες πιπέτες 10 mL και 25 mL

Αναλυτική πορεία:

Για την παρασκευή των διαλυμάτων αλάτων ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα του κάθε άλατος σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.3**), και διαλύθηκε σε δις απεσταγμένο νερό Milli Q. Με βάση τα διαλύματα αλάτων παρασκευάστηκαν τα τρία διαλύματα πέψης SSF, SGF και SIF. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων αυτών ήταν 400 mL και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1) Μεταφέρθηκε κατάλληλη ποσότητα των διαλυμάτων αλάτων σε τρία δοχεία Duran (ένα για κάθε διάλυμα πέψης), σύμφωνα με τον πίνακα (**Πίνακας 3.3**). Τα δοχεία συμπληρώθηκαν με νερό Milli Q μέχρι τελικού όγκου 400 mL.

2) Προστέθηκε σε κάθε δοχείο HCl 6M σε ποσότητες που αναφέρονται στον πίνακα (**Πίνακας 3.3**) για την ρύθμιση του pH.

3) Τα διαλύματα μοιράστηκαν σε σωλήνες τύπου falcons 50 mL και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20 °C.

Πίνακας 3.3: Ποσότητες αλάτων για την παρασκευή των διαλυμάτων SSF, SGF και SIF (Προσαρμοσμένο από Brodtkorb *et al.*, 2019).

| Διαλύματα αλάτων | SSF (PH 7) | | SGF (PH 3) | | SIF (PH 7) | | | |
|---|----------------------|------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| | Συγκεντρώσεις αλάτων | | Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x) | Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SSF | Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x) | Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SGF | Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x) | Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SIF |
| | (g/L) | (M) | (ml) | (mM) | (ml) | (mM) | (ml) | (mM) |
| KCl | 37,3 | 0,5 | 15,1 | 15,1 | 6,9 | 6,9 | 6,8 | 6,8 |
| KH ₂ PO ₄ | 68 | 0,5 | 3,7 | 3,7 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,1 |
| NaHCO ₃ | 84 | 1 | 6,8 | 13,6 | 12,5 | 25 | 42,5 | 85 |
| NaCl | 117 | 2 | - | - | 11,8 | 47,2 | 9,6 | 38,4 |
| MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ | 30,5 | 0,15 | 0,5 | 0,15 | 0,4 | 0,12 | 1,1 | 0,33 |
| (NH ₄) ₂ CO ₃ | 48 | 0,5 | 0,06 | 0,06 | 0,5 | 0,5 | - | - |
| HCl | 44,1 | 6 | 0,09 | 1,1 | 1,3 | 15,6 | 0,7 | 8,4 |
| CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ | | 0,3 | 0,025 | 1,5 | 0,005 | 0,15 | 0,04 | 0,6 |

Το CaCl₂(H₂O)₂ διαλύθηκε σε νερό και προστέθηκε ξεχωριστά από τα υπόλοιπα άλατα σε κάθε φάση της πέψης.

3.1.2.4. Διαδικασία προσομοίωσης των τριών φάσεων της πέψης (στοματική, γαστρική, εντερική).

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μίμηση της διέλευσης του τροφίμου από το στόμα (στοματική φάση), το στομάχι (γαστρική φάση) και το έντερο (εντερική φάση) κατά την πέψη, με την προσθήκη των κατάλληλων διαλυμάτων, τη ρύθμιση του pH και την επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν υπολογίστηκαν ανά δείγμα σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 3.4). Συγκεκριμένα, οι ποσότητες των ενζύμων (πεψίνη, παγκρεατίνη) και των χολικών αλάτων (Πίνακας 3.5) ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων με βάση τον αριθμό των δειγμάτων προς πέψη και διαλύθηκαν σε διάλυμα Tris (10 mM) και NaCl (150 mM) με pH=6,5, η πεψίνη, και σε νερό Milli Q η παγκρεατίνη και τα χολικά άλατα. Πριν τη χρήση τα ένζυμα διατηρήθηκαν σε πάγο ενώ τα χολικά άλατα σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Ομοίως προθερμάθηκαν σε υδατόλουτρο (37 °C) και τα διαλύματα αλάτων (SSF, SGF, SIF) πριν τη προσθήκη τους σε κάθε φάση. Τα ένζυμα αμυλάση και γαστρική λιπάση δεν προστέθηκαν στη στοματική και γαστρική φάση αντίστοιχα, λόγω απουσίας αμύλου στα δείγματα και χαμηλής λιποπερικτικότητας. Επίσης να αναφερθεί πως για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις πέψης (Α και Β). Αναλυτικά οι τρεις φάσεις περιγράφονται παρακάτω.

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Δείγματα τυρογάλακτος
- Πεψίνη (Sigma-Aldrich, P7012)
- Tris buffer 10 mM (Duchefa biochemie, T1501.1000)
- NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich 746398-500G)
- Παγκρεατίνη από πάγκρεας χοίρου (Sigma-Aldrich, P3292)
- Χολικά άλατα (bile extract porcine, Sigma-Aldrich B8631)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 5mM
- Καυστικό νάτριο (NaOH) 5mM
- Διάλυμα $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$
- Δυσασπιονισμένο νερό (milli Q) και απεσταγμένο νερό για καθαρισμό πεχαμέτρου
- Διαλύματα αλάτων SSF, SGF και SIF

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Σωλήνες τύπου falcon 50 mL
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius TE214S)
- Αναρροφητήρας (accu-jetpro)
- Πεχάμετρο ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (BANTE instruments 920)
- Υδατόλουτρο
- Πάγος για τη διατήρηση των ενζύμων κατά την διάρκεια του πειράματος
- Επωαστικός κλίβανος (Mettler)
- Αναδευτήρες κυκλικής περιστροφής
- Φίλτρα (Millex, 0,22 μm)
- Φυγόκεντρος (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)

Πίνακας 3.4: Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά φάση της γαστρεντερικής πέψης για 5 g δείγματος (Προσαρμοσμένο από Brodtkorb *et al.*, 2019).

| Εισαγωγή | 5 g υγρού ή στερεού τροφίμου | | | | |
|--|------------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|--------------|
| | Στοματική (SSF) | Γαστρική (SGF) | | Εντερική (SIF) | |
| Τρόφιμο ή πεπτικό υγρό | 5 g τροφίμου | 10 ml στοματικής φάσης | | 20 ml γαστρικής φάσης | |
| 1,25x διαλύματα ηλεκτρολυτών | 4 | 8 | | 8 | |
| CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (0,3 M) (ml) | 0,025 | 0,005 | | 0,04 | |
| Ένζυμα | Σιελική αμυλάση | Πεψίνη | Γαστρική λιπάση | Τρυψίνη σε παγκρεατίνη | Χολικά άλατα |
| Ενεργότητα ενζύμων (U/ml) ή συγκέντρωση χολικών οξέων (mM) στο τελικό υγρό πέψης (τελικό όγκος σε ml σε κάθε φάση της πέψης) | 75 U/ml | 2000 U/ml | 60 U/ml | 100 U/ml | 10 Mm |
| Ειδική ενεργότητα (U/mg), συγκέντρωση (χολικών οξέων) mmol/g | 100 U/mg | 3000 U/mg | 25 U/mg | 6 U/mg | 0,667 mmol/g |
| Συγκέντρωση ενζύμου/χολικών οξέων (mg/ml) | 10 | 20 | 100 | 133,3 | 200 |
| Όγκος ενζύμου/χολικών οξέων (ml) | 0,75 | 0,667 | 0,48 | 5 | 3 |
| H ₂ O (ml) | 0,225 | 0,448 | | 3,16 | |
| HCl (5M) για προσαρμογή του PH (ml) | - | 0,4 | | - | |
| NaOH (5M) για προσαρμογή του PH (ml) | - | - | | 0,8 | |
| Τελικός όγκος (ml) | 10 | 20 | | 40 | |

Πίνακας 3.5: Ποσότητες ενζύμων και χολικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα.

| Ένζυμα και χολικά άλατα | Ποσότητα (mg * αριθμός δειγμάτων +1) |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Πεψίνη | 18,7* (n+1) |
| Παγκρεατίνη | 444,4 *(n+1) |
| Χολικά άλατα | 57,4* (n+1) |

Αναλυτική πορεία:

Στοματική φάση (Oral phase)

1) Αρχικά, ζυγίστηκε ορισμένη ποσότητα από κάθε δείγμα μικροφυκών και γιαουρτιών, και αραιώθηκε με νερό Milli Q μέχρι τελικού όγκου 5 mL σε σωλήνα τύπου falcon, προκειμένου να εξισορροπηθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων (40 mg πρωτεΐνης/mL για όλα τα δείγματα).

2) Ακολούθησε η προσθήκη 4 mL /δείγμα του διαλύματος SSF (1:1 v/v) και 25 μL του άλατος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂, 1,5 mM).

3) Ύστερα από ανάδευση πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH και προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH, 5M) για τη ρύθμιση του pH στο 7.

4) Το μίγμα συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τελικού όγκου 10 mL και επώαστηκε για 2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37 °C υπό ανάδευση.

Γαστρική φάση (Gastric phase)

1) Στο μίγμα που προέκυψε από την προηγούμενη φάση προστέθηκαν 8 mL του διαλύματος SGF (1:1v/v), 1 mL διαλύματος πεψίνης (2.000 U/mL) και 5 μ L CaCl₂ (0,15 mM).

2) Μετρήθηκε το pH και προστέθηκε ορισμένη ποσότητα HCl (5M) για την αύξηση της οξύτητας στην τιμή pH=3.

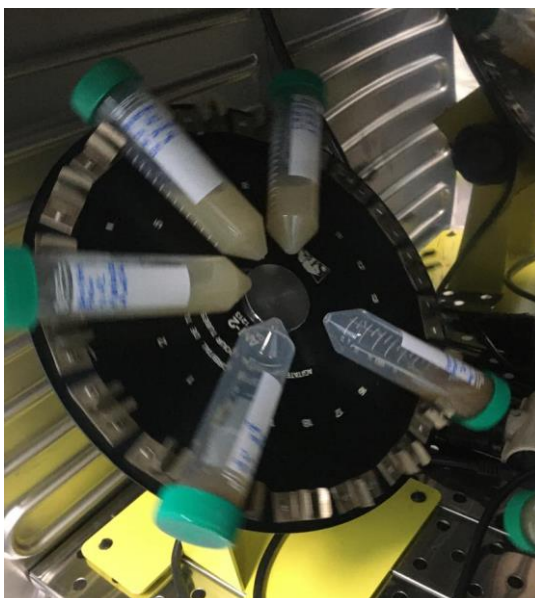
3) Το μίγμα συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τελικού όγκου 20 mL και επώαστηκε σε κλίβανο στους 37 °C για 2 ώρες υπό κυκλική ανάδευση.

Εντερική φάση (Intestinal phase)

1) Μετά την πάροδο των δύο ωρών, στο προϊόν της γαστρικής φάσης προστέθηκαν 8 mL διαλύματος SIF, 2,87 mL χολικών αλάτων (10 mM), 20 μ L CaCl₂ (0,6 mM) και 2,5 mL παγκρεατίνης (100 U/mL).

2) Πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στην τιμή 7 με την προσθήκη διαλύματος NaOH (5M).

3) Προστέθηκε νερό μέχρι τελικού όγκου 40 mL και το μίγμα επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C για 2 ώρες υπό κυκλική ανάδευση (**Εικόνα 3.4**).



Εικόνα 3.4: Δείγματα κατά τη διάρκεια επώασης και κυκλικής ανάδευσης στην εντερική φάση της *in vitro* πέψης.

Ομοίως πραγματοποιήθηκε και η πέψη του αρνητικού μάρτυρα (blank) όπου αντί για το δείγμα προστέθηκε νερό (H₂O).

3.1.2.5. Χειρισμός των δειγμάτων μετά την πέψη

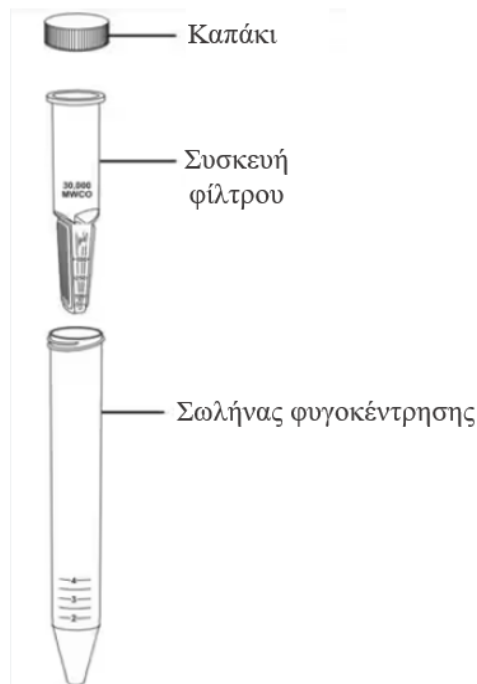
Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, τα τελικά προϊόντα υπέστησαν θερμικό σοκ στους 85 °C για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση των ενζύμων και τον τερματισμό της διαδικασίας πέψης. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στα 1.200 g και φιλτράρισμα του υπερκείμενου με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,22 μm για την απομάκρυνση των αδιάλυτων σωματιδίων.

3.1.3. Απομόνωση κλάσματος πεπτιδίων από προϊόντα πέψης

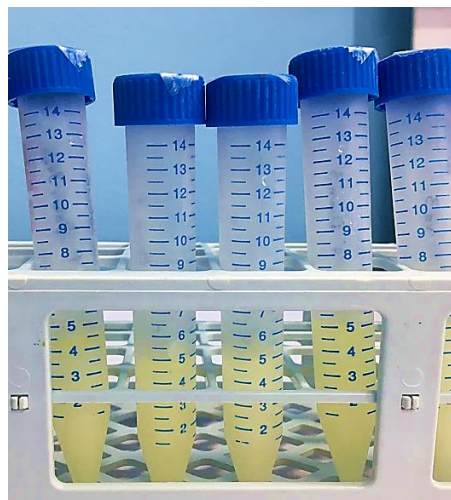
Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες με προσαρμοσμένες μεμβράνες φίλτρων (Merck Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units, 10 kDa MWCO)
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες με προσαρμοσμένες μεμβράνες φίλτρων (Merck Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units, 3 kDa MWCO)

Σε συνέχεια της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας, στα προϊόντα φιλτραρίσματος εφαρμόστηκαν επιπρόσθετες φυγοκεντρήσεις με σκοπό την παραλαβή κλασμάτων πεπτιδίων μεγέθους μικρότερου από 3 kDa. Έτσι, αρχικά τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες (τύπου falcon 15 mL) με προσαρμοσμένες μεμβράνες διαπερατότητας μορίων μεγέθους μικρότερου των 10 kDa (**Εικόνα 3.5**) και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 4.000 g. Αποτέλεσμα ήταν να προκύψουν δύο κλάσματα πεπτιδίων: ένα κλάσμα με πεπτίδια μεγέθους > 10 kDa (πάνω μέρος μεμβράνης) και ένα με πεπτίδια μεγέθους < 10 kDa (κάτω μέρος μεμβράνης). Το τελευταίο κλάσμα (< 10 kDa) φυγοκεντρήθηκε ξανά για 2 ώρες στα 4.000 g (25 °C), εντός σωλήνων με κατάλληλες μεμβράνες, με συνέπεια να προκύψει ομοίως ένα κλάσμα με πεπτίδια μεγέθους > 3 kDa και ένα με πεπτίδια μεγέθους < 3 kDa (**Εικόνα 3.6**). Το κλάσμα πεπτιδίων με μέγεθος < 3 kDa απομονώθηκε και διατηρήθηκε υπό κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 3.5: Φυγοκεντρικός σωλήνας με προσαρμοσμένη μεμβράνη φίλτρου (Προσαρμοσμένο από: Merck, 2023).



Εικόνα 3.6: Κλάσματα πεπτιδίων με μέγεθος < 3 kDa εντός φιαλιδίων τύπου falcon (15 mL).

3.2. Προσδιορισμός διαλυτότητας δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στα μικροφύκη ύστερα από *in vitro* πέψη (ferrozine assay)

Ο σίδηρος στα τρόφιμα βρίσκεται σε δύο χημικές μορφές: υπό τη μορφή κατιόντων δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+} ή ferrous) και κατιόντων τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+} ή ferric). Ο δισθενής σίδηρος παρουσιάζει υψηλότερη διαλυτότητα και απορροφάται πιο εύκολα από τον οργανισμό συγκριτικά με τον τρισθενή σίδηρο, καθώς ο τελευταίος είναι πιο επιρρεπής στον σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων (Allen, 2002; Rana & Prajapati, 2021; Kougia *et al.*, 2023).

Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας δισθενούς (βιοδιαθέσιμου) σιδήρου στα δείγματα μικροφυκιών που προαναφέρθηκαν (**Ενότητα 3.1.1.1.**) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της φερροζίνης (ferrozine assay) όπως αυτή περιγράφεται από τους Argyri *et al.* (Argyri, Komaitis & Kapsokefalou, 2006; Argyri *et al.*, 2009). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια χρωματομετρική ανάλυση κατά την οποία το χρωμογόνο αντιδραστήριο της φερροζίνης (ένυδρο άλας μονονάτριου 3-(2-πυριδυλ-)-5,6-διφαινυλ-1,2,4-τριαζινο-*p,p*- δισουλφιδικό οξύ) δεσμεύει το δισθενή σίδηρο Fe^{2+} (ferrous) στο δείγμα και σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο (ferrous complex) ιώδους χρώματος η απορρόφηση του οποίου μετριέται στα 562 nm (Viollier *et al.*, 2000). Η συγκέντρωση του Fe^{2+} (μM) υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης σιδήρου $FeCl_3$ (1mM) (standards), σύμφωνα με τον νόμο του Beer-Lambert (Beer 's Law), ενώ η διαλυτότητά του (%) αποτέλεσε το πηλίκο της συγκέντρωσης του σιδήρου Fe^{2+} στα δείγματα μετά την πέψη προς τον ολικό σίδηρο των δειγμάτων πριν την πέψη $\times 100\%$. Έτσι, το ποσοστό του δισθενούς σιδήρου που μπορεί να διαλυθεί χρησιμοποιείται ως δείκτης της βιοδιαθεσιμότητάς του (Argyri *et al.*, 2006).

Ωστόσο, δεδομένου ότι το αντιδραστήριο της φερροζίνης δεσμεύει μόνο το ferrous και όχι το ferric προς σχηματισμό συμπλόκου (ferrous complex), η παρουσία τριθενούς σιδήρου Fe^{3+} (ferric) στον ολικό σίδηρο (ferrous + ferric) των δειγμάτων πριν τη πέψη πιθανόν να παρεμβάλλεται στο χρωματισμό του συμπλόκου καθώς μπορεί να αντιδράσει με τη φερροζίνη (Viollier *et al.*, 2000; Nielsen, 2017). Συνεπώς, για τον προσδιορισμό του ολικού σιδήρου, στα δείγματα πριν τη πέψη προηγείται ένα βήμα μετατροπής του Fe^{3+} σε Fe^{2+} (reducing) με τη χρήση διαλύματος καθίζησης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution-RPPS) που περιέχει μονοϋδροχλωρική υδροξυλαμίνη.

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Χρωμογόνο αντιδραστήριο φερροζίνης (Ferrozine reagent) διαλυμένο σε νερό (5mg/mL)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid sodium salt) (0,3 M) (Life Science)
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA)
- Μονοϋδροχλωρική υδροξυλαμίνη
- HCl (37%)
- Δις απεσταγμένο νερό (Milli Q)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Σωλήνες τύπου erpendorf (1,5 mL)
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου και ρύγχη
- Πλάκα 96-οπών
- Μηχάνημα ανάδευσης vortex (Scientific Industries, Vortex genie 2)

- Φυγόκεντρος (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)
- Φασματοφωτόμετρο (Tecan, Infinite M200 Nanoquat)

Αναλυτική πορεία:

1) Αρχικά παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα (standards) FeCl_3 (1mM) με γνωστές συγκεντρώσεις σιδήρου (0, 2,5, 10, 40, 160 και 1000 μM).

2) Έπειτα παρασκευάστηκαν 10 mL του διαλύματος καθίζησης πρωτεΐνης (reducing protein precipitant solution-RPPS) και 10 mL διαλύματος μη καθίζησης πρωτεΐνης (non-reducing protein precipitant solution-NRPPS) όπως περιγράφεται παρακάτω:

- RPPS: 1 g τριχλωροξικό οξύ, 0,5 g μονοϋδροχλωρική υδροξυλαμίνη, 1 ml HCl 37% και 9 ml H_2O .
- NRPPS: παρασκευάστηκε όπως το RPPS με εξαίρεση την απουσία μονοϋδροχλωρικής υδροξυλαμίνης

3) Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού σιδήρου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μικροφυκών πριν την πέψη (μικροφύκη διαλυμένα σε νερό) (**Εικόνα 3.7**), στα οποία προστέθηκε το διάλυμα RPPS (0,5 ml RPPS σε 1ml δείγματος), ενώ για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο των φυγοκεντρημένων προϊόντων πέψης των μικροφυκών, στα οποία προστέθηκε ίδια ποσότητα διαλύματος NRPPS. Στα πρότυπα διαλύματα προστέθηκε RPPS.

4) Έπειτα τα δείγματα (2 επαναλήψεις για κάθε συνθήκη) επώαστηκαν για ένα βράδυ σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν στα 5.000 g για 10 λεπτά.

5) Απομονώθηκε το υπερκείμενο (0,2 ml) και στο καθένα προστέθηκαν 0,4 ml ρυθμιστικού διαλύματος Hepes και 0,1 ml φερροζίνης.

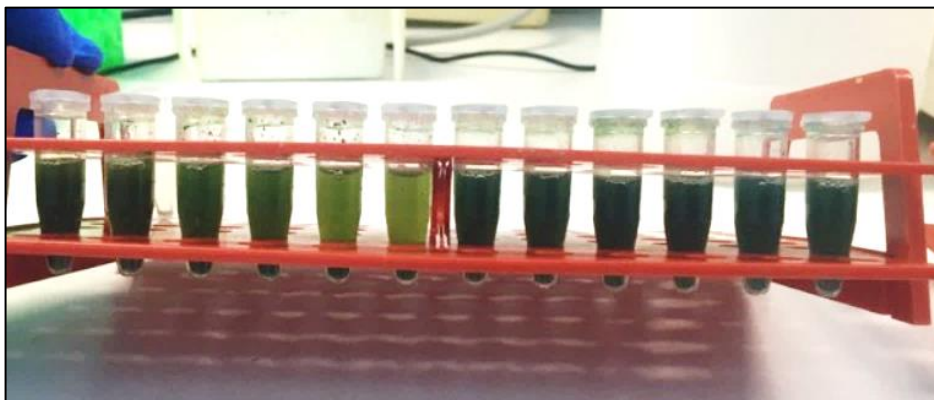
6) Ακολούθησε καλή ανάδευση (vortex) και μεταφορά 140 μL των δειγμάτων σε πλάκα 96-οπών (διπλή μέτρηση για κάθε δείγμα).

7) Η απορρόφηση προσμετρήθηκε στα 562 nm άμεσα μετά την προσθήκη της φερροζίνης για τον προσδιορισμό του ferrous και μετά από 1 ώρα για τον προσδιορισμό του ολικού σιδήρου.

Τέλος οι συγκεντρώσεις του ολικού και δισθενούς σιδήρου προσδιορίστηκαν από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς ($y=824,35*x+1,1685$, $R^2=0,9992$) που αποτέλεσε τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων σιδήρου FeCl_3 (μM) σε συνάρτηση

με τις μετρήσεις απορρόφησης (A). Το ποσοστό του διαλυτού σιδήρου (ferrous) υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Διαλυτότητα (\%)} = \frac{\text{Συγκέντρωση } \textit{ferrous} (\mu\text{M})}{\text{Συγκέντρωση ολικού σιδήρου (ferrous+ferric)(}\mu\text{M)}} \times 100 \%$$



Εικόνα 3.7: Δείγματα μικροφυκών πριν την πέψη που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού σιδήρου με τη μέθοδο της φερροζίνης.

3.3. Μελέτη Ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων

Η μελέτη των ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων πραγματοποιήθηκε στα πεπτιδικά κλάσματα (< 3 kDa) τόσο των μικροφυκών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (*Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris*), όσο και των δειγμάτων επιδορπίου γιαουρτιού, σκέτου γιαουρτιού, βιομάζας της *Spirulina platensis* και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της, που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους, ύστερα από *in vitro* πέψη. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.1. Χειρισμοί κυτταρικής σειράς

3.3.1.1. Κυτταρική σειρά

Για τους πειραματικούς σκοπούς της μελέτης χρησιμοποιήθηκε μία ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, η THP-1 που προσφέρθηκε ευγενώς από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

I. THP-1 κύτταρα

Τα THP-1 κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των (προ-) μονοκύτταρων και μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε μακροφάγα. Πιο ειδικά, η THP-1 είναι μία κυτταρική σειρά

ανθρώπινης μονοκυτταρικής λευχαιμίας που απομονώθηκε από το αίμα ενός αρσενικού ασθενούς (ηλικίας 1 έτους) με οξεία μορφή αυτής της ασθένειας. Η σειρά αυτή διαθέτει στρογγυλή μορφολογία (21 μm) ως μονοκύτταρα (με χρόνο διπλασιασμού περίπου 20-48 ώρες) και χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο μελέτης της ανοσορυθμιστικής απόκρισης σε βιοενεργά συστατικά διαφόρων τροφίμων καθώς παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: 1) ομοιότητα στις αποκρίσεις με το αντίστοιχο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερειακού αίματος (Chanput *et al.*, 2010) 2) είναι «αθάνατες» κυτταρικές σειρές που μπορούν να διατηρηθούν για αρκετές γενιές και να ανακαλλιεργηθούν χωρίς μεταβολές στη δραστηριότητα και την ευαισθησία των κυττάρων (Bosshart & Heinzelmann, 2016) 3) μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να επηρεαστεί η ζωτικότητα και τα χαρακτηριστικά των μονοκύτταρων-μακροφάγων, και 4) μεγάλη ταχύτητα πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα υψηλή απόδοση σε αριθμό κυττάρων. Τέλος να αναφερθεί πως οι καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών *in vitro* πραγματοποιούνται αρχικά σε εναιώρημα στο θρεπτικό μέσο, ενώ μετά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα προσκολούνται στον πυθμένα της πλάκας καλλιέργειας και είναι μονοστρωματικές (monolayer) (Chanput *et al.*, 2014). Οι συνθήκες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών περιλαμβάνουν αλκαλικό pH (7,3-8), θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το χειρισμό της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς στο εργαστήριο περιγράφεται παρακάτω.

3.3.1.2. Καλλιέργεια κυττάρων

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (medium) RPMI 1640 (Biosera) συμπληρωμένο με:

- 10% Βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum-FBS, Gibco)
- 1% L-Γλουταμίνη (Sigma-Aldrich G7513, L- Glutamine)
- 1% Πενικιλίνη-Στρεπτομικίνη (Sigma-Aldrich P4333, Penicillin-Streptomycin)
- 1% Πυροσταφυλικό Νάτριο (Sodium Pyruvate, BioFroxx 1565ML)
- 1% Μη απαραίτητα αμινοξέα (Non Essential Amino Acids, NEAA, HIMEDIA ACL002)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich D2650)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Πλαστικές πιπέτες (10 mL)
- Αναρροφητήρας (accu-jet pro)
- Υδατόλουτρο στους 37 °C
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας διαφόρων όγκων (50 mL, 250 mL, 750 mL)
- Φυγόκεντρος (Hettich UNIVERSAL 2)
- Σωλήνες τύπου Falcons (15 mL)

- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)
- Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials)
- Δοχείο ψύξης κυττάρων με υγρό άζωτο
- Κλίβανος επώασης

Αναλυτική πορεία:

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow) και κάτω από πλήρως ασηπτικές συνθήκες σε ξεχωριστό χώρο του εργαστηρίου, για την αποφυγή επιμολύνσεων. Αρχικά παρασκευάστηκε το μέσο καλλιέργειας. Έπειτα, καθώς οι κυτταρικές σειρές ήταν αποθηκευμένες σε υγρό άζωτο (-196 °C) εντός κρυοφιαλιδίων (cryovials) πραγματοποιήθηκε η απόψυξή τους. Τα κύτταρα αποψύχθηκαν μέσω επώασης σε υδατόλουτρο στους 37 °C, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο τύπου falcon μαζί με θρεπτικό μέσο και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1.500 στροφές, ώστε να απομακρυνθεί το κυτταροτοξικό διμέθυλο σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO), το οποίο περιέχεται στο διάλυμα κρυο-συντήρησης ως κρυο-προστατευτική ουσία. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10 mL θρεπτικού μέσου. Κατόπιν τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φλάσκα καλλιέργειας όγκου 50 mL και τοποθετήθηκαν στον ειδικό κλίβανο επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂. Μετά την πάροδο 24 ωρών η ανάπτυξη των κυττάρων και η πυκνότητά τους (confluency) παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

3.3.1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (passaging-subculturing)

Σκοπός

Καθώς τα κύτταρα της καλλιέργειας πολλαπλασιάζονται στο εναιώρημα, αυξάνεται η πυκνότητά τους. Όταν η πυκνότητα αυξηθεί κατά 50-60% πρέπει να γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (passaging ή subculturing) σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Αυτό αποσκοπεί στη διατήρηση του προς μελέτη βιολογικού υλικού, διότι διαφορετικά είναι πιθανό να επέλθει κυτταρικός θάνατος εξαιτίας της συσσώρευσης των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων και της μείωσης της κυτταρικής δραστηριότητας λόγω περιορισμένου χώρου (Kleiveland, 2015).

Αναλυτική πορεία:

Οι ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνταν κάθε 24-48 ώρες ανάλογα με την εικόνα που παρουσίαζαν τα κύτταρα κατά την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο μέχρι να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι ενέργειες που εφαρμόζονταν ήταν οι ακόλουθες:

1) Αρχικά, τα κύτταρα συλλέγονταν από τις φλάσκες σε σωληνάρια των 15 mL και φυγοκεντρώνταν για 5 λεπτά στις 1.500 στροφές ώστε να αποβληθούν τα μεταβολικά προϊόντα και οι τοξίνες. Η παλαιώση του μέσου ανάπτυξης γινόταν ορατή από τη μεταβολή του χρώματός του από φούξια-ροζ σε πορτοκαλί.

2) Το υπερκείμενο απορρίπτονταν και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε φρέσκο προθερμασμένο θρεπτικό μέσο (37 °C).

3) Τέλος, τα κύτταρα με το μέσο καλλιέργειας μεταφέρονταν κάθε φορά σε μεγαλύτερη φιάσκα καλλιέργειας (250 mL και 750 mL) η οποία συμπληρωνόταν με επιπλέον ποσότητα φρέσκου RPMI 1640. Η διαδικασία συνεχιζόταν μέχρι να αποκτηθεί επαρκής ποσότητα κυττάρων για το πείραμα.

3.3.1.4. Μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer

Η πλάκα Neubauer αποτελεί μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα με δικό της κάλυμμα (καλυπτρίδα) που χρησιμοποιείται για τη καταμέτρηση μικροσκοπικών δομών όπως τα κύτταρα του αίματος ή κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα (π.χ. κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας). Κατά τη χρήση της, το κυτταρικό εναιώρημα εφαρμόζεται στην άκρη της καλυπτρίδας από όπου απορροφάται με τη δράση τριχοειδούς φαινομένου και γεμίζει με δείγμα τα ειδικά πλέγματα της πλάκας. Ο αριθμός των κυττάρων στα πλέγματα μπορεί να μετρηθεί άμεσα σε μικροσκόπιο. Για τις περισσότερες εφαρμογές, η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα του πλέγματος της πλάκας (Absher, 1973). Σκοπός της διαδικασίας είναι ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στο εναιώρημα και η αξιολόγηση της επάρκειάς τους για το πείραμα που ακολουθεί.

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Trypan blue 0,2% (w/v) (Sigma-Aldrich T6146)
- Phosphate buffer saline (PBS, Takara Bio)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Πλάκα Neubauer με καλυπτρίδα (αιμοκυτταρόμετρο)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου (Nichipet EX 2 J15409341)

Αναλυτική πορεία:

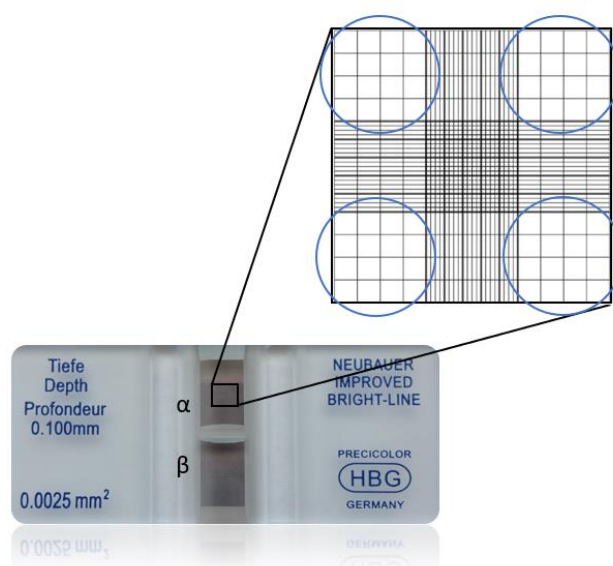
Για τη μέτρηση των κυττάρων της καλλιέργειας, αναμείχθηκε ορισμένη ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων με ισότονο διάλυμα trypan blue σε αναλογία 1:1, και αραιώθηκε με PBS. Στη συνέχεια 10 μ L από το εναιώρημα αυτό μεταφέρθηκαν στα ειδικά πλέγματα

μέτρησης της πλάκας Neubauer, α και β όπως επισημαίνονται στην **Εικόνα 3.8**. Καθώς τα ζωντανά κύτταρα είναι πολύ επιλεκτικά στις ενώσεις που διαπερνούν τη μεμβράνη τους, το αντιδραστήριο trypan blue εισχωρεί εύκολα στα νεκρά κύτταρα και τα χρωματίζει σκούρο μπλε επιτρέποντας έτσι τη διάκριση των νεκρών από τα ζωντανά κύτταρα κατά την παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο (Kleiveland, 2015). Έτσι, μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο τα ζωντανά κύτταρα που βρίσκονταν στα πλέγματα εντός των τεσσάρων χώρων που περιβάλλονται από τους μπλε κύκλους της **Εικόνας 3.8**. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$M \times \Sigma \times 10^4 \text{ κύτταρα /mL}$$

Όπου Σ είναι ο συντελεστής αραίωσης και Μ ο μέσος όρος των κυττάρων που μετρήθηκαν στις τέσσερις περιοχές του πλέγματος.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε και για τα δύο πλέγματα της πλάκας (α και β της **Εικόνας 3.8**) με αποτέλεσμα ο τελικός αριθμός των κυττάρων να προέκυψε από το μέσο όρο των μετρήσεων των δύο πλεγμάτων.



Εικόνα 3.8: Πλάκα Neubauer και πλέγματα μέτρησης κυττάρων (Προσαρμοσμένο από: <https://www.desertcart.gr/products/21783832>).

3.3.1.5. Διαφοροποίηση των μονοκύτταρων THP-1 σε μακροφάγα

Η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα πραγματοποιήθηκε με την έκθεσή τους σε διάλυμα phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες έκθεσης των κυττάρων στο PMA, που είναι απαραίτητες ώστε τα μονοκύτταρα να εμφανίσουν μια άριστη μορφολογική κατάσταση με έντονη προσκολλητική

ικανότητα στο πιάτο καλλιέργειας και σε μεγάλο ποσοστό κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, δοκιμάστηκε η έκθεση τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του PMA και για διαφορετικούς χρόνους επώασης. Συγκεκριμένα, για την κυτταρική σειρά THP-1 δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 150 ng/mL του PMA και επώαση για 24, 48 και 72 ώρες για κάθε συγκέντρωση. Επιπλέον, δοκιμάστηκαν οι 24 και 48 ώρες στην φάση “ανάπαυσης” (rest phase) χωρίς PMA με σκοπό την ενίσχυση της διαφοροποίησης. Συμπερασματικά βρέθηκε πως οι ιδανικές συνθήκες έκθεσης των κυττάρων THP-1 στο PMA είναι η επώαση για 48 ώρες σε συγκέντρωση 100 ng/mL και “ανάπαυση” για 24 ώρες οι οποίες και εφαρμόστηκαν. Η διαφοροποίηση σε φαινότυπο μακροφάγου γίνεται εμφανής ύστερα από αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων από σφαιρικό **σχήμα** σε επίπεδο και αμοιβαδοειδές και την προσκόλληση τους στον πυθμένα του πιάτου καλλιέργειας (Chanput *et al.*, 2014).

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- Bacterial lipopolysaccharides (LPS) από *Escherichia coli* (TLR4 agonist) (Sigma, O111:B4) διαλυμένο σε 1X phosphate- buffered saline (PBS).
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate buffer saline, TAKARA)

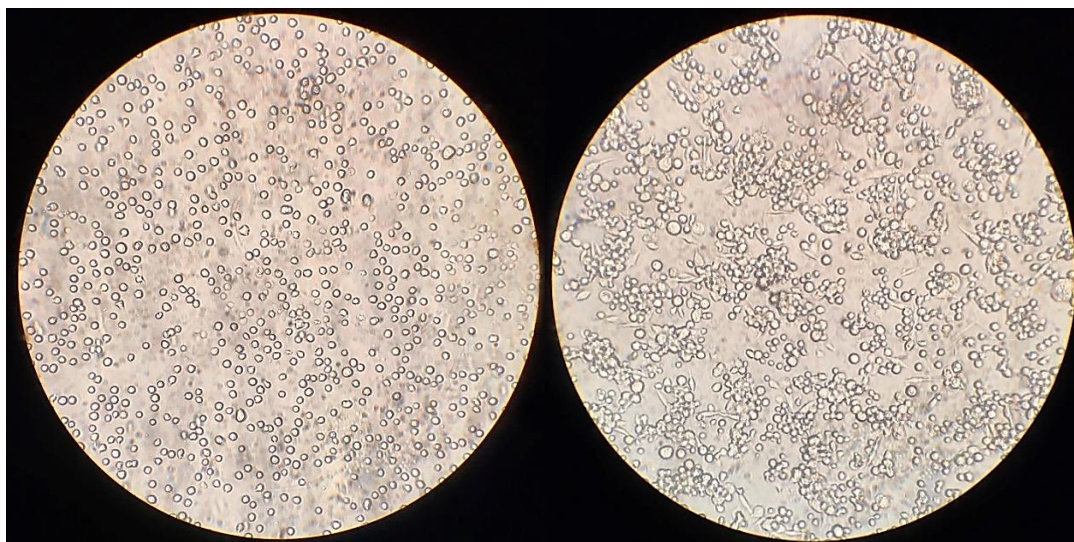
Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Πιάτα καλλιέργειας 12 οπών
- Πιπέτες (5, 10 και 25 mL) και Αναρροφητήρας
- Σωλήνες τύπου Falcons (50 mL)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά ορισμένος όγκος εναιωρήματος κυττάρων, στα οποία προηγήθηκε φυγοκέντρηση και ανανέωση με 10 mL φρέσκο RPMI 1640, μεταφέρθηκαν σε σωλήνα τύπου falcon 50 mL και αραιώθηκε με RPMI 1640 ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση κυττάρων $0,8 \times 10^6$ κύτταρα/mL θρεπτικού μέσου (ή $1,2 \times 10^6$ κύτταρα/ οπή του πιάτου καλλιέργειας), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μέτρησης των κυττάρων (Daigneault *et al.*, 2010; Chanput, 2014). Στο εναιώρημα αυτό προστέθηκε κατάλληλος όγκος του PMA σε συγκέντρωση 100 ng/mL. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων με την κατάλληλη ποσότητα PMA μεταφέρθηκε στις 12 οπές των πιάτων καλλιέργειας με τελικό όγκο σε κάθε οπή 1,5 mL. Τα πιάτα επώαστηκαν (37°C , 5% CO_2) για 48 ώρες και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Η διαφοροποίηση των κυττάρων ήταν ορατή από την αλλαγή στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.9**, και την προσκόλλησή τους στον πυθμένα του πιάτου καλλιέργειας. Μετά την πάροδο των 48 ωρών, το εναιώρημα απομακρύνθηκε και τα κύτταρα

ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Το PBS συλλέχθηκε από τις οπές και απορρίφθηκε συμπαρασύροντας και τα μη διαφοροποιημένα μονοκύτταρα και υπολείμματα των κυττάρων. Τέλος, οι οπές με τα προσκολλημένα πλέον μακροφάγα συμπληρώθηκαν με 1,5 mL RPMI (37°C) και αφέθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες (rest phase-φάση “ανάπαυσης”).



Εικόνα 3.9: Μονοκύτταρα (αριστερά) και Μακροφάγα (δεξιά) THP-1 όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγεθυντικό φακό 20x.

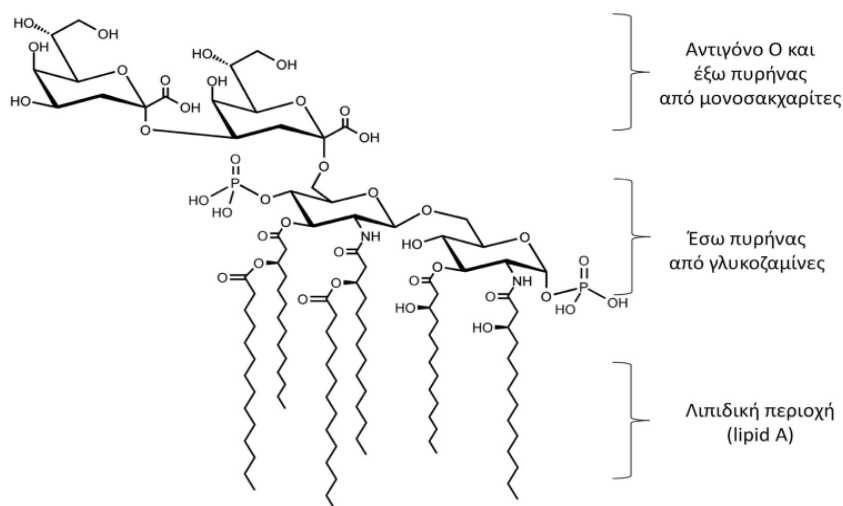
3.3.1.6. Διέγερση των κυττάρων με λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

Το LPS (lipopolysaccharide) είναι λιποπολυσακχαρίτης που απομονώθηκε από το κυτταρικό τοίχωμα Gram αρνητικών (-) βακτηρίων και φαίνεται πως επηρεάζει σημαντικά τη φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων όταν προσβάλλονται από τα βακτήρια αυτά. Για παράδειγμα, μια τέτοια απόκριση είναι η έκφραση προ- και αντί-φλεγμονωδών κυτοκινών (Chanput *et al.*, 2010; Bosshart & Heinzelmann, 2016).

Το μόριο του LPS συνίσταται από τρεις περιοχές (**Εικόνα 3.10**): α) τη λιπιδική περιοχή ή λιπίδιο A (ενεργό μέρος), ένα φωσφολιπίδιο της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων που ευθύνεται για τις ενδοτοξικές ιδιότητες του LPS με αποτέλεσμα να προκαλεί την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, β) τον εσωτερικό πυρήνα ολιγοσακχαρίτη που συνδέεται με το λιπίδιο A και γ) την εξωτερική περιοχή O-πολυσακχαρίτη που διαθέτει υψηλή ποικιλομορφία και αποτελεί τη περιοχή στόχο για τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή (Λέκκα *et al.*, 2015).

Έτσι, μετά την έκθεση των διαφοροποιημένων κυττάρων σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα όπως το LPS αυτά παρουσιάζουν αυξημένη προσκολλητική και φαγοκυτταρική ικανότητα, αυξημένη έκκριση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως υπεροξειδίου, παράγοντες νέκρωσης

όγκων (TNF) και κυτοκινών, καθώς και αυξημένη έκφραση γονιδίων που επάγουν την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων (Chanput, 2012; Lund *et al.*, 2016). Για το λόγο αυτό τα διαφοροποιημένα μακροφάγα εκτέθηκαν σε 100 ng/mL διαλύματος LPS, το οποίο προστέθηκε ύστερα από τη φάση “ανάπαυσης” στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων για 24 ώρες, με σκοπό την απομίμηση μιας ήπιας φλεγμονώδους κατάστασης και τη διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης των κυττάρων αυτών.

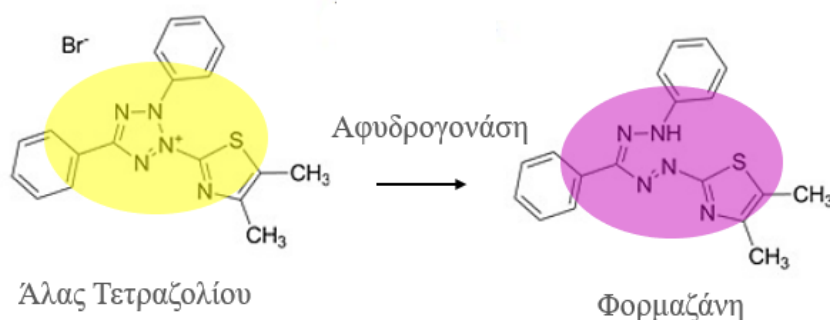


Εικόνα 3.10: Δομή βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (Λέκκα *et al.*, 2015).

3.3.2. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

Η δοκιμή MTT (Microculture Tetrazolium Test) αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ή του πολλαπλασιασμού/ βιωσιμότητας των κυττάρων. Βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ανάγουν το κίτρινο άλας τετραζολίου (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) σε ιώδεις κρυστάλλους φορμαζάνης με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου, αφυδρογονάση (Εικόνα 3.11). Συνεπώς, η τεχνική αυτή απαιτεί μεταβολικώς ενεργά μιτοχόνδρια ώστε να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι εντός των κυττάρων. Οι κρύσταλλοι είναι δυνατόν να διαλυτοποιηθούν σε κατάλληλους οργανικούς διαλύτες και η ένταση του παραγόμενου ιώδους χρώματος, που προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 570 nm, είναι ανάλογη της βιωσιμότητας των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη της τοξικότητας μιας ουσίας. Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος MTT χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η μέγιστη συγκέντρωση των πεπτιδίων των δειγμάτων (μικροφύκη και επιδόρπια γιαουρτιού) που δεν προκαλούν τοξικότητα στα κύτταρα, ύστερα από την έκθεσή τους σε αυτά. Η διαδικασία που

ακολουθήθηκε στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος (MTT Cell Growth Kit) της εταιρίας Merck και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



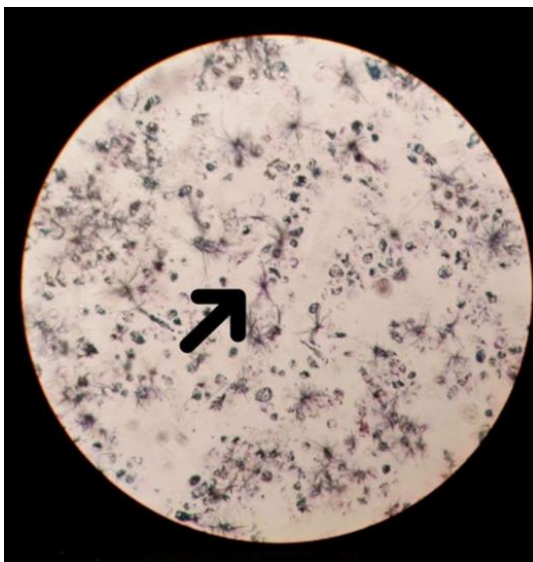
Εικόνα 3.11: Αναγωγή κίτρινου άλατος τετραζολίου σε ιώδες κρύσταλλο φορμαζάνης παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση (Προσαρμοσμένο από Riss *et al.*, 2016).

Αναλυτική πορεία:

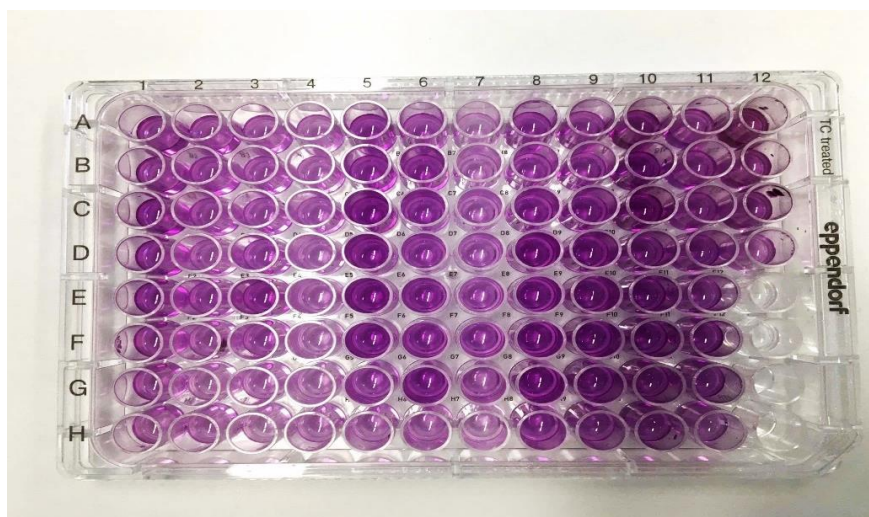
Αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα MTT με διάλυση της σκόνης σε PBS ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 5 mg/mL. Έπειτα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων (8×10^4 κύτταρα/ 100 μ L) με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 παρουσία FBS 10% (v/v), και επώαστηκαν (37°C , 5% CO_2) για 48 ώρες για να διαφοροποιηθούν. Στη συνέχεια, αφού ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS, αφέθηκαν για 24 ώρες σε φρέσκο θρεπτικό υλικό στον επωαστικό θάλαμο για τη φάση “ανάπαυσης”. Μετά από 24 ώρες το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και οι διάφορες θέσεις της πλάκας, με τα προσκολλημένα πλέον κύτταρα στον πυθμένα κάθε θέσης, συμπληρώθηκαν με θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε τα πεπτίδια των δειγμάτων και LPS σε τελικό όγκο 100 μ L/θέση. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα μικροφυκών πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκθεσης των κυττάρων σε κλάσμα πεπτιδίων μεγέθους < 3 kDa σε αναλογίες 10% (10 μ L κλάσμα πεπτιδίων/ 90 μ L θρεπτικού υλικού), 20% και 50% της αρχικής συγκέντρωσης πεπτιδίων στα δείγματα (40 mg πρωτεΐνης/mL). Για τα επιδόρπια γιαουρτιού και τους μάρτυρες τους στα κύτταρα εφαρμόστηκαν ομοίως πεπτίδια μεγέθους < 3 kDa σε αναλογίες 10%, 20% και 25%. Για κάθε διαφορετικό ποσοστό πεπτιδίων εφαρμόστηκαν τρεις επαναλήψεις και ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στα πεπτίδια των δύο δειγμάτων και στο LPS ήταν 24 ώρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το θρεπτικό μέσο με τα πεπτίδια και το LPS αφαιρέθηκαν και σε κάθε θέση της πλάκας προστέθηκε 0,5 mg MTT /mL θρεπτικού μέσου. Ακολούθησε επώαση (37°C , 5% CO_2) για 3 ώρες και ύστερα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης στον πυθμένα των θέσεων της πλάκας, ως δείκτης ικανοποιητικής κατακρήμνισης του MTT από τα ζωντανά

κύτταρα (**Εικόνα 3.12**). Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με το MTT, οι κρύσταλλοι διαλυτοποιήθηκαν σε 100 μ L DMSO υπό ανάδευση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιώδους χρώματος (**Εικόνα 3.13**). Όσο πιο έντονο το ιώδες χρώμα στο κελί, τόσο μικρότερη η κυτταροτοξικότητα των πεπτιδίων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 570 nm και εξαγωγή των μετρήσεων με τη χρήση του λογισμικού Magellan 7,1 SP1. Ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) χρησιμοποιήθηκε το DMSO χωρίς κύτταρα, ενώ θετικό μάρτυρα (positive control) αποτέλεσαν τα κύτταρα χωρίς την προσθήκη πεπτιδίων. Τελικά, η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Βιωσιμότητα (\%)} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος} - \text{Απορρόφηση DMSO}}{\text{Απορρόφηση μάρτυρα} - \text{Απορρόφηση DMSO}} \times 100 \%$$



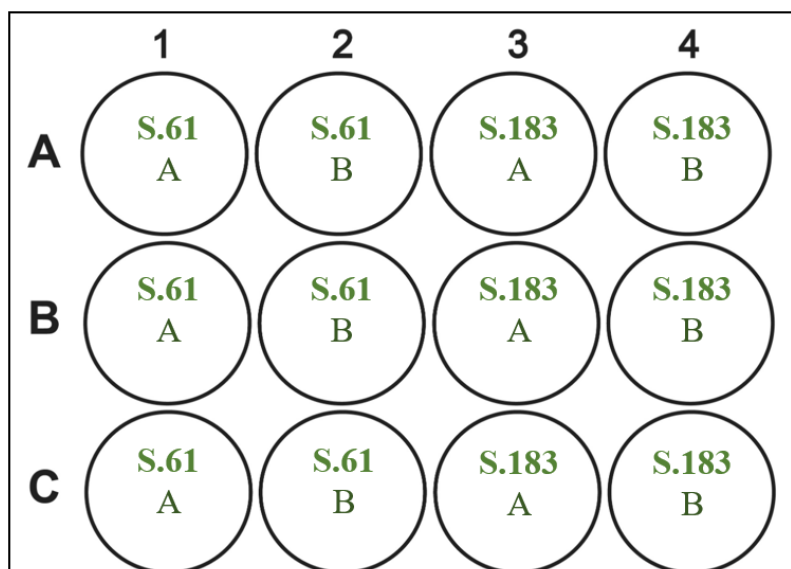
Εικόνα 3.12: Σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης από μακροφάγα THP-1 κατά τον προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε συγκεντρώσεις $0,8 \times 10^5$ κύτταρα/οπή, και σε μεγεθυντικό φακό 20x. Με βέλος υποδεικνύεται ένας κρύσταλλος φορμαζάνης.



Εικόνα 3.13: Πλάκα 96-φρεατίων με διαλυτοποιημένους σε DMSO κρυστάλλους φορμαζάνης. Όσο πιο έντονο το ιώδες χρώμα στο κελί της πλάκας, τόσο περισσότεροι οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίστηκαν, άρα τόσο περισσότερα βιώσιμα κύτταρα και μικρότερη η κυτταροτοξικότητα από την έκθεση στην εκάστοτε συγκέντρωση του δείγματος.

3.3.3. Έκθεση των κυττάρων στα πεπτίδια των δειγμάτων

Σύμφωνα με τις ενδείξεις της μεθόδου MTT, βρέθηκε πως η ελάχιστη κυτταροτοξικότητα προκλήθηκε από την έκθεση των κυττάρων σε ποσοστό 10% της αρχικής συγκέντρωσης πεπτιδίων στα δείγματα μικροφυκών (< 3 kDa) (40 mg πρωτεΐνης /mL) και επιδορπίων γιουρτιού (< 3 kDa) για 24 ώρες. Συνεπώς, με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής MTT και της βιβλιογραφικής ανασκόπησης (Cha *et al.*, 2008; Hernandez *et al.*, 2017) τα διαφοροποιημένα με PMA μακροφάγα (**Ενότητα 3.3.1.5.**), ταυτόχρονα με τη διέγερση με LPS, εκτέθηκαν για 24 ώρες στις προαναφερόμενες περιεκτικότητες πεπτιδίων των δύο κατηγοριών δειγμάτων όπως παρουσιάζεται στη παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3.14**). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις της έκθεσής τους με σκοπό τον περιορισμό του σφάλματος χειρισμού και μέτρησης καθώς και για τη λήψη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.14: Παράδειγμα εισαγωγής δειγμάτων σπιρουλίνας (S.61 και S.183) σε πλάκα 12-φρεατίων κατά την έκθεση των κυττάρων στο κλάσμα πεπτιδίων της *Spirulina platensis*. Τα γράμματα A και B αντιστοιχούν στις δύο επαναλήψεις *in vitro* πέψης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα.

3.3.4. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

3.3.4.1. Απομόνωση ολικού RNA κυττάρων με NucleoZOL

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο NucleoZOL. Το NucleoZOL είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικού γουανιδινίου που χρησιμοποιείται για την απομόνωση μικρών και μεγάλων μορίων RNA από διάφορα υλικά όπως κύτταρα, ιστοί, βακτήρια κ.ά. Αρχικά, τα κύτταρα λύνονται και ομογενοποιούνται στο αντιδραστήριο από τη δράση της φαινόλης και του θειοκυανικού γουανιδινίου. Μολυσματικά μόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες κατακρημνίζονται με την προσθήκη νερού και απομακρύνονται με φυγοκέντηση (**Εικόνα 3.15**). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη ξεχωριστή απομόνωση μικρών και μεγάλων μορίων RNA με προσθήκη αιθανόλης και ισοπροπανόλης αντίστοιχα. Τέλος, το ολικό RNA μπορεί να ανασυσταθεί με νερό απαλλαγμένο από RNase (User Manual-NucleoZOL). Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του RNA βασίστηκε στις οδηγίες του αντιδραστηρίου και ήταν η ακόλουθη:

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- NucleoZOL (Macherey-Nagel, 200ML)
- Ισοπροπανόλη 100 % (Sigma-Aldrich, 33539-2,5 L)
- 80 % διάλυμα αιθανόλης (EtOH)
- Δις απεσταγμένο νερό-RNase-free (dePC H₂O)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)
- Σωλήνες τύπου erpendorf (1,5 mL)
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου και ρύγχη
- Θερμομπλόκ στους 65 °C
- Μηχάνημα ανάδευσης vortex (Scientific Industries, Vortex genie 2)
- Nanodrop- UV-Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)

Αναλυτική πορεία:

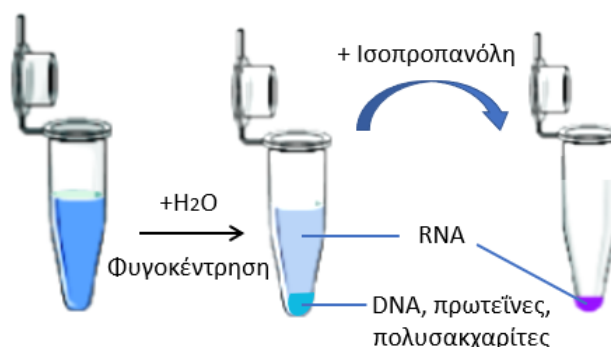
- 1) Αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI 1640 από κάθε οπή του πιάτου καλλιέργειας.
- 2) Στα προσκολλημένα πλέον κύτταρα προστέθηκαν 500 μ L NucleoZOL, για να πραγματοποιηθεί η λύση τους, αναδεύτηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο.
- 3) Τα δείγματα αφού ομογενοποιήθηκαν με vortex, διατηρήθηκαν στους -20 °C. Πριν τη χρήση τους επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Για κάθε 500 μ L λύματος NucleoZOL προστέθηκαν 200 μ L δις απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από RNase (RNase-free), αναδεύτηκαν δυναμικά και διατηρήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου για την κατακρήμνιση των κυτταρικών υπολειμμάτων (DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες). Το υπερκείμενο με το RNA (500 μ L) απομονώθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο (**Εικόνα 3.15**).
- 6) Για κάθε 500 μ L υπερκειμένου προστέθηκαν 500 μ L ισοπροπανόλης για την καθίζηση του RNA.
- 7) Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 12.000 g.

8) Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά ενώ το λευκό ίζημα (RNA pellet) ξεπλύθηκε με 500 μL αιθανόλης (80 %) και φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 12.000 g.

9) Το βήμα (8) επαναλήφθηκε.

10) Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε ενώ το ίζημα RNA επαναδιαλύθηκε σε H_2O με ανάδευση και θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά.

11) Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop.



Εικόνα 3.15: Διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA κυττάρων με NucleoZOL.

3.3.4.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop. Αναλύοντας 1 μL δείγματος, το φασματόμετρο NanoDrop μπορεί να δώσει τα εξής δεδομένα:

- τη συγκέντρωση των επιθυμητών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA),
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης OD 260/280)
- την καθαρότητα του δείγματος ως προς άλλες ουσίες όπως EDTA υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης OD 260/230).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρεται 1 μL ddH₂O στην υποδοχή της συσκευής για τον μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μL από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής, η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους OD 260/OD280 και OD 260/OD230. Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD 260/280 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0, ενώ ο δείκτης OD 260/230 πρέπει να κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, μεταξύ 2.0-2.2.

3.3.4.3. Καθαρισμός ολικού RNA με DNase I

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA απομονώνεται και μέρος του γονιδιωματικού DNA. Για την αποφυγή λήψης εσφαλμένων αποτελεσμάτων κατά την μελέτη της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυμα που κόβουν/καταστρέφουν το DNA και αφήνουν ανέπαφο το RNA (Dotti, 2011). Έτσι, για την αποικοδόμηση και την απομάκρυνση του DNA, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (DNase I). Η DNase I είναι μια ενδονουκλεάση που διασπά τυχαία το DNA και απελευθερώνει δι-, τρι-, και ολιγονουκλεοτίδια δρώντας τόσο σε δίκλωνο όσο και σε μονόκλωνο μόριο DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στην ενεργοποίηση και δράση του ενζύμου με θέρμανση σε συγκεκριμένες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας που εφαρμόζονται από έναν θερμοκυκλοποιητή. Για τη διαδικασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου kit της εταιρίας New England Biolabs και όλα τα αντιδραστήρια κατά την διάρκεια του πειράματος διατηρήθηκαν σε πάγο.

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- DNase I Reaction buffer 10X (New England Biolabs, B0303S)
- DNase I (RNase-free) (New England Biolabs, M0303L)
- Γλυκογόνο
- Οξικό αμμώνιο (0.3M τελική συγκέντρωση, pH 5.2)
- 100% διάλυμα αιθανόλης (absolute EtOH)
- EDTA 0,5 M
- Δις απεσταγμένο νερό (dePC H₂O)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου και ρύγχη
- Μηχάνημα ανάδευσης vortex (Scientific Industries, Vortex genie 2)
- Σωλήνες τύπου eppendorf (0,50 mL)
- Φυγόκεντρος (Biofuge pico, Heraeus instruments)
- Nanodrop- UV-Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)
- Θερμικός κυκλοποιητής

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά για κάθε δείγμα/συνθήκη, σε σωλήνα τύπου eppendorf 500 μL τοποθετήθηκαν:

- 5000 ng ολικού RNA
- 4 μL του DNase I Reaction buffer
- 1 μL (2 units) DNase I και συμπληρώθηκαν με dePC H₂O μέχρι τελικού όγκου 40 μL.

Τα δείγματα επώαστηκαν στον θερμοκυκλοποιητή στους 37 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 1 μL EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ), μιας χειλικής ένωσης που δεσμεύει τα μέταλλα όπως Mg⁺⁺ και είναι απαραίτητη για τη δράση των νουκλεασών, προστατεύοντας έτσι το RNA, και τα δείγματα επώαστηκαν ξανά στους 75 °C για 10 λεπτά.

3.3.4.4. Κατακρήμιση RNA

Σε συνέχεια της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας, ανά δείγμα προστέθηκαν 4 μL οξικού αμμωνίου, 1 μL γλυκογόνου και 100 μL 100% διάλυμα αιθανόλης και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους - 80 °C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 12.000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα (RNA απαλλαγμένο πλέον από DNA) επαναδιαλύθηκε σε dePC H₂O με ανάδευση σε vortex και θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά. Τέλος, έγινε επαναληπτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop για έλεγχο της καθαρότητας και ακεραιότητάς του.

3.3.4.5. Αντίστροφη μεταγραφή (*Reverse Transcription, RT*)

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας κατά την οποία το ολικό RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, (*reverse transcriptase*) το οποίο στη φύση παράγεται από ρετροϊούς (RNA-ιούς). Οι ρετροϊοί χρησιμοποιούν το ένζυμο για να μετατρέπουν το γενετικό υλικό τους από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Εκτός από το ένζυμο, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση απαραίτητη είναι και η χρήση κατάλληλων εκκινητών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Oligodeoxythymidylic acid (Oligo dT) και τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές (random hexamers/6-mers). Οι Oligo dT είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-(A) ουρά των mRNAs, ενώ οι random 6-mers απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση (Deprez *et al.*, 2002). Οι εκκινητές προσδένονται στο μόριο RNA και επιτρέπουν στο ένζυμο να τα επιμηκύνει (στους 37 °C για 15 λεπτά που επιτυγχάνονται από τον θερμοκύκλοποιητή), παράγοντας cDNA συμπληρωματικό του αρχικού RNA. Στη συνέχεια, με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (85°C, 5 sec) καταστρέφονται η αντίστροφη μεταγραφάση και η αλυσίδα του RNA. Το cDNA που παράγεται από την αντίστροφη μεταγραφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR). Για την

εκτέλεση της διαδικασίας ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της εταιρίας Takara (Takara BioInc.).

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Δις απεσταγμένο νερό (Milli Q)
- PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara BioInc.) που περιέχει:
 - PrimeScript Buffer (for Real Time)
 - PrimeScript RT Enzyme Mix
 - Oligo dT Primer (50 μM)
 - Random 6 mers (100 μM)
 - RNase Free dH₂O

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου και ρύγχη
- Σωλήνες τύπου Eppendorf (0,2 mL και 1,5 mL)
- Θερμικός κυκλοποιητής

Αναλυτική πορεία:

1) Αρχικά με βάση τις μετρήσεις του NanoDrop, σε κάθε δείγμα RNA προστέθηκε ορισμένη ποσότητα νερού Milli Q ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 500 ng RNA/αντίδραση για τελικό όγκο της αντίδρασης τα 10 μL.

2) Έπειτα, προετοιμάστηκε το μίγμα της αντίδρασης (master mix) με ανάμειξη των αντιδραστηρίων του σκευάσματος (kit), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.6**).

Πίνακας 3.6: Όγκοι αντιδραστηρίων ανά δείγμα για την παρασκευή 10 μL του αντιδρώντος μίγματος (master mix) της αντίστροφης μεταγραφής (Προσαρμοσμένο από: Takara, 2008) .

| <Per reaction> Reagent | Volume | Final conc. |
|---------------------------------------|----------|-------------|
| 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2 μl | 1X |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 0.5 μl | |
| Oligo dT Primer (50 μM)*1 | 0.5 μl | 25 pmol |
| Random 6 mers (100 μM)*1 | 0.5 μl | 50 pmol |
| total RNA (500 ng) | } 6,5 μl | |
| RNase Free dH ₂ O | | |
| Total | 10 μl*2 | |

3) 3,5 μL του master mix προστέθηκαν σε κάθε δείγμα RNA και τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή όπου επωάστηκαν στις παρακάτω συνθήκες:

- 37 °C για 15 min (αντίστροφη μεταγραφή)
- 85 °C για 5 sec (απενεργοποίηση αντίστροφης μεταγραφάσης)

- 4 °C (ψύξη cDNA)

4) Τέλος τα σωληνάρια με τα δείγματα cDNA διατηρήθηκαν στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

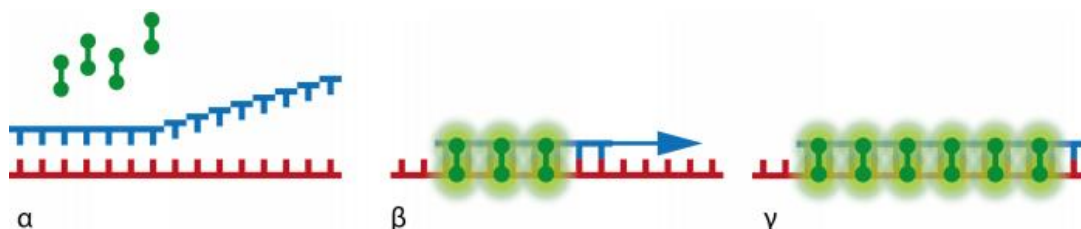
3.3.4.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR*)

Η έκφραση ενός γονιδίου σε ένα κύτταρο μπορεί να μετρηθεί από τον αριθμό των αντιγράφων ενός μετάγραφου RNA του γονιδίου αυτού που υπάρχει σε ένα δείγμα. Προκειμένου να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί η γονιδιακή έκφραση από μικρές ποσότητες RNA, είναι απαραίτητη η ενίσχυση του μετάγραφου του γονιδίου. Αυτό επιτυγχάνεται με την τεχνική της PCR η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kary Mullis το 1983. Η τεχνική αυτή μιμείται τη φυσική ικανότητα ενός κυττάρου να αντιγράφει το DNA. Συνίσταται στην πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής της επιθυμητής αλληλουχίας DNA (μήτρα DNA) από μία DNA πολυμεράση, παρουσία κατάλληλων εκκινητών και ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (A,T,G και C) που αναφέρονται ως dNTP (deoxyribonucleotide Triphosphate), με αποτέλεσμα την παραγωγή *in vitro* δισεκατομμυρίων αντιγράφων DNA. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό κατάλληλες συνθήκες θέρμανσης και επώασης σε αυτές, οι οποίες επιτυγχάνονται από έναν θερμικό κυκλοποιητή. Αρχικά η μήτρα DNA εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες (συνήθως 92-95 °C) ώστε να αποδιαταχθεί. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται (συνήθως στους 47-72 °C) ώστε να επιτευχθεί πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών στη μήτρα DNA. Οι εκκινητές οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης (που συνήθως πραγματοποιείται στους 47-72 °C), η DNA πολυμεράση αντιγράφει τους δύο κλώνους ξεκινώντας από τους εκκινητές και χρησιμοποιώντας τα ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους. Ο αριθμός των μορίων DNA κατά τη διαδικασία αυτή αυξάνεται εκθετικά καθώς σε κάθε κύκλο αντιγραφής διπλασιάζεται και με την πάροδο του χρόνου φτάνει σε ένα μέγιστο πλατώ (Seidman, A. L., 2010; Cooper & Hausman, 2013).

Η qPCR αποτελεί μία αυτοματοποιημένη τεχνική ποσοτικοποίησης και ενίσχυσης μορίων DNA ή cDNA που έχουν προέλθει από αντίστροφη μεταγραφή του προς μελέτη RNA. Στη παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η Real-Time qPCR κατά την οποία η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω ανίχνευσης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Έτσι, επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί σε πραγματικό χρόνο όλη τη διαδικασία της αντίδρασης (Cooper & Hausman, 2013).

I. Τεχνική ανίχνευσης προϊόντων qPCR

Η ποσοτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο των προϊόντων της qPCR επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών και μη ειδικών φθορίζουσών χρωστικών (όπως η SYBRGreen I) που προσδένονται σε αυτά. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται επιλεκτική ενίσχυση της αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα και διμερή, που ενισχύονται παράλληλα. Στην παρούσα εργασία, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής ICGreen 2 (Fast Gene IC Green 2 x qPCR Universal Mix, NIPPON Genetics). Η χρωστική αυτή ανήκει στις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές και παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα, ενώ φθορίζει όταν ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA (Εικόνα 3.16). Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Όσο περισσότερα PCR προϊόντα παράγονται, τόσο μεγαλύτερη η ένταση του φθορισμού. Ο τελευταίος ανιχνεύεται από το ειδικό σύστημα του θερμικού κυκλοποιητή στον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση και λαμβάνεται η τιμή C_t (Cycle threshold) για κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των PCR προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline) και εξαρτάται μόνο από την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα. Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA-στόχου στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορα θα ανιχνευτεί το σήμα φθορισμού, αποδίδοντας χαμηλότερες τιμές C_t (Bonab, 2015).



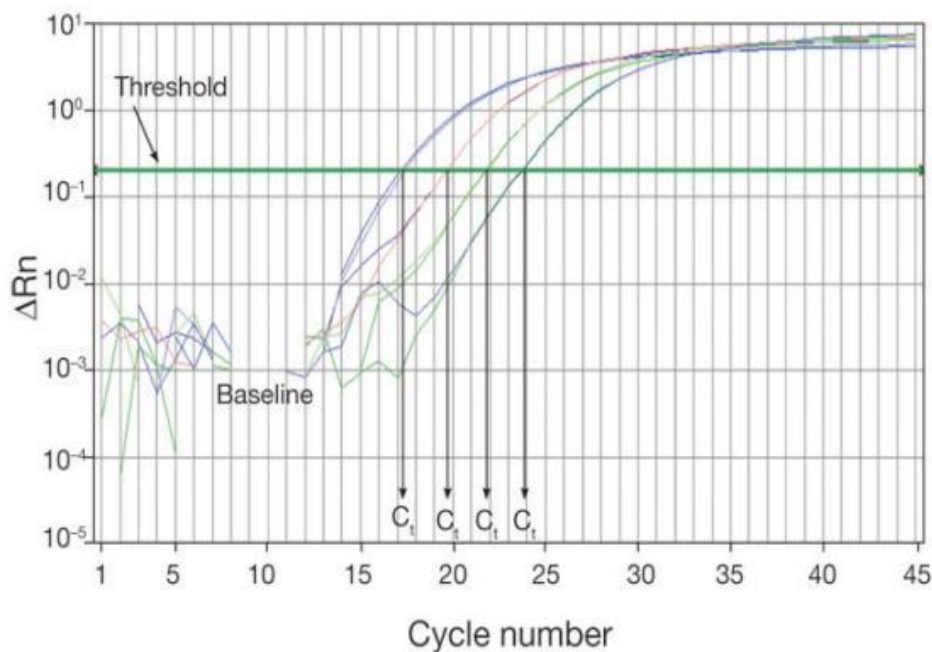
Εικόνα 3.16: Μηχανισμός δράσης της χρωστικής IC Green 2 (Παλαιολόγου *et al.*, 2015).

II. Καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot)

Η γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης (καμπύλη ενίσχυσης/amplification plot) αποτελεί συνάρτηση του φθορισμού (ΔRn) σε σχέση με τους κύκλους της αντίδρασης (Εικόνα 3.17). Η καμπύλη αυτή αποτελείται από τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), τα προϊόντα κάθε κύκλου διπλασιάζονται με ακρίβεια, δεδομένου ότι όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση (εκκινητές, πολυμεράση, ελεύθερα νουκλεοτίδια) βρίσκονται σε περίσσεια (αποδοτικότητα 100%). Καθώς η αντίδραση συνεχίζεται, τα αντιδραστήρια εξαντλούνται και επέρχεται η

γραμμική φάση. Ταυτόχρονα η συσσώρευση διαφόρων αναστολέων μειώνει την αποδοτικότητα της αντίδρασης και την οδηγεί σε σημείο κορεσμού (plateau).

Ως βασικό επίπεδο (baseline) χαρακτηρίζεται το χαμηλού επιπέδου σήμα το οποίο παράγεται κατά τους πρώτους κύκλους (3ο-15ο κύκλο) της qPCR, όταν δηλαδή ο φθορισμός δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές και αποτελεί το «θόρυβο» της αντίδρασης. Η οριζόντια γραμμή της γραφικής παράστασης είναι το κατώφλι (threshold) πάνω από το οποίο το σήμα του φθορισμού παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με το βασικό επίπεδο. Το σημείο στο οποίο η καμπύλη κάθε δείγματος τέμνει το κατώφλι αντιστοιχεί στην τιμή C_t .



Εικόνα 3.17: Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης qPCR. Κάθε καμπύλη με διαφορετικό χρώμα αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό δείγμα (Bonab, 2015).

III. Εκκινητές (Primers)

Για την έναρξη της αντίδρασης και την οριοθέτηση της επιθυμητής αλληλουχίας του cDNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (primers) για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε. Οι εκκινητές είναι μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του DNA-στόχου. Ο ένας εκκινητής είναι συμπληρωματικός ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας του γονιδίου-στόχου και ο άλλος ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου-στόχου αντίστοιχα. Δεδομένου ότι η αντιγραφή ενός κλώνου του DNA πραγματοποιείται με κατεύθυνση 5'-3', η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο 5' άκρο χαρακτηρίζεται ως forward primer (F), ενώ εκείνη που αντιστοιχεί στο 3' άκρο ως reverse primer (R). Η DNA πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και επιμηκύνει την αλυσίδα

προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια σχηματίζοντας έτσι τη συμπληρωματική αλυσίδα του επιθυμητού γονιδίου (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012).

Ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών είναι μια παράμετρος κριτικής σημασίας για την επιτυχή αντίδραση και την αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του εκκινητή παραμένει προσδεμένο στην αλληλουχία-στόχο, ενώ το υπόλοιπο 50% έχει αποδεσμευτεί και βρίσκεται σε μονόκλωνη κατάσταση. Η ιδανική T_m κυμαίνεται από 63-67 °C, οπότε η θερμοκρασία πρόσδεσης (Temperature annealing, T_a) των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο είναι 58-62 °C. Χαμηλότερη T_m των εκκινητών έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων, καθώς οι εκκινητές θα έχουν τη δυνατότητα να υβριδοποιούνται και σε λιγότερο ειδικές θέσεις. Αντίθετα υψηλότερες T_m μπορεί να οδηγήσουν σε παραγωγή λιγότερου προϊόντος αφού μειώνεται η πιθανότητα υβριδοποίησης των εκκινητών. Η T_m εξαρτάται από την αλληλουχία και το μήκος του εκκινητή. Ιδανικοί θεωρούνται οι εκκινητές που έχουν μήκος 17-28 bp και περιεχόμενο σε GC σε ποσοστό 40-60%. Επιπλέον κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να έχει παραπλήσιες T_m , οι οποίες δεν πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 4 °C (Παλαιολόγου *et al.*, 2015).

Η συγκέντρωση των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης είναι επίσης σημαντική για την απόδοσή της. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις πιθανόν να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό επιπλέον αλληλουχιών πέραν της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να περιορίσουν την απόδοση της αντίδρασης (Seidman, 2010).

IV. Καμπύλη αναφοράς (Standard curve)

Η αποδοτικότητα των εκκινητών (Efficiency (E) of primers) αποτελεί επίσης βασική παράμετρο για την επιτυχή εκτέλεση της qPCR, καθώς καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την αποδοτικότητα ενίσχυσης-αντιγραφής των μορίων-στόχων (DNA, cDNA) ανά κύκλο της αντίδρασης. Κύριες αιτίες χαμηλής αποδοτικότητας συνιστούν ο λανθασμένος σχεδιασμός εκκινητών καθώς και οι μη βέλτιστες συγκεντρώσεις αντιδραστήριου εκκινητών ή συνθήκες της αντίδρασης. Ένα επιθυμητό εύρος αποδοτικότητας αποτελούν τα ποσοστά 90% -110%. Για τον έλεγχο της αποδοτικότητας των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, δημιουργήθηκε μια καμπύλη αναφοράς (standard curve) με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων cDNA. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων cDNA ώστε να επιτευχθούν πρότυπες συγκεντρώσεις. Έπειτα, στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκε qPCR, όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 3.3.4.6.-VII**, για κάθε ζεύγος εκκινητών των προς μελέτη γονιδίων. Η καμπύλη αναφοράς αποτέλεσε τη γραφική παράσταση του λογάριθμου των πρότυπων συγκεντρώσεων cDNA ($\log(\text{ng}/\mu\text{L})$) (άξονας X) ως προς τις αντίστοιχες τιμές C_t που προέκυψαν από την αντίδραση PCR (άξονας Y). Η ποιότητα της καμπύλης κρίθηκε με

βάση το συντελεστή συσχέτισης (R), ενώ η αποτελεσματικότητα των εκκινητών και συνεπώς της αντίδρασης (E_x), προσδιορίστηκε από την κλίση (slope) της ευθείας σύμφωνα με την εξίσωση:

$$E_x = (10^{-1/\text{slope}})^{-1}$$

όπου για να επιτευχθεί αποδοτικότητα 90-100% πρέπει η κλίση της ευθείας να παίρνει τιμές: $-3,6 \geq \text{κλίση} \geq -3,3$ (Deprez *et al.*, 2002).

Οι εκκινητές (Eurofins Genomics) ανθρώπινων γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με χρήση του λογισμικού προγράμματος PERLPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.7**):

Πίνακας 3.7: Αλληλουχίες, Αποδοτικότητα και Συγκέντρωση εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

| ΓΟΝΙΔΙΑ | FORWARD PRIMER (F) | REVERSE PRIMER (R) | ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ (%) | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (nM) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|------------------|
| RPL37 | AGTACACTTGCTCTTTCTGTGG | GGAAGTGGTATTGTACGTCCAG | 106 | 300 |
| B2m | GCTATCCAGCGTACTCCA | CTTAACTATCTTGGGCTGTGAC | 103 | 300 |
| HPRT1 | CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG | CAAATCCAACAAAGTCTGGCT | 106 | 300 |
| RPS18 | CTGAGGATGAGGTGGAACG | CAGTGGTCTTGGTGTGCT | 98 | 300 |
| IL-1 β | CAGATGAAGTGCTCCTTCCAG | CCTCGTATCCCATGTGTCG | 99 | 300 |
| IL-10 | CATGCTTCGAGATCTCCGAG | AACCCAGGTAACCCCTTAAAGTC | 103 | 300 |
| TLR-4 | GATTTATCCAGGTGTGAAATCCAG | TAGAGATGCTAGATTTGTCTCCAC | 105 | 300 |
| TLR-2 | ATCAGCAGGAACAGAGCACA | ACTCAGGAGCAGCAAGCAC | 102 | 300 |
| IL-8 | GCTAAAGAAGTTAGATGTCAGTGC | AACTTCTCCACAACCCCTCTG | 97 | 300 |
| TGF- β | TGAACCCGIGTTGCTCTC | TAGTGAACCCGTTGATGTCC | 94 | 300 |
| TNF- α | TTCCCTCAGCCTCTTCTCCT | GAGGGTTTGCTACAACATGG | 100 | 200 |
| TNF-rec | GTTCCACCTTCACCTCCAG | GGGTCATCAGTGTCTAGGC | 99 | 150 |
| NF- κ B | GCACAAGGAGACATGAAACAG | CCCAGAGACCTCATAGTTGTC | 97 | 300 |
| NF κ B-RELA | GGACTACGACCTGAATGCTG | ACCTCAATGTCCCTTTCTGC | 105 | 300 |
| IL-12 β | GGACATCATCAAACCTGACCC | AGGGAGAAGTAGGAATGTGGAG | 105 | 300 |
| COX-2 | CTCAGCCATACAGCAAATCCT | GGACTGTCAATCAAATGTGATCTG | 97 | 300 |
| IL-6 | GGATTCAATGAGGAGACTTGC | CATTTGTGGTTGGGTCAGG | 95 | 300 |
| MMP9 | ACAAGCTCTTCGGCTTCTG | ACAAACTGTATCCTTGGTCCG | 90 | 300 |
| ICAM | CAGACCTTTGTCCTGCCA | TCGTTGCCATAGGTGACTG | 95 | 300 |
| LST1 | CGGAATGATGTAAGAGGCTG | AGGCATAGTCAGCTCTTGG | 103 | 300 |
| MyD88 | GACCAAATTTGCACTCAGCCT | AGACAGTGATGAACCTCAGGA | 103 | 200 |
| IRF5 | GGAAATACACCGAAGGCGT | ATCCTCTGCAGCTCTTCTCCT | 108 | 300 |
| MCP-1 | ATAGCAGCCACCTTCATTC | CAATGGTCTTGAAGATCACAGC | 102 | 300 |
| STAT1 | TACACCTACGAACATGACCCT | ACCAACAGTCTCAACTCACAG | 109 | 300 |
| STAT2 | CCATCAGCCAACTGAAAGAC | ATCCAGCACCTCCTTTCTC | 104 | 300 |

V. Σχετική ποσοτικοποίηση

Τα γονίδια RPL37 (Ribosomal Protein L37), B2m (Beta-2-microglobulin), RPS18 (Ribosomal Protein S18), και HPRT1 (Hypoxanthine Phosphorybosiltransferase 1) χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για να εξομαλύνουν τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα είτε

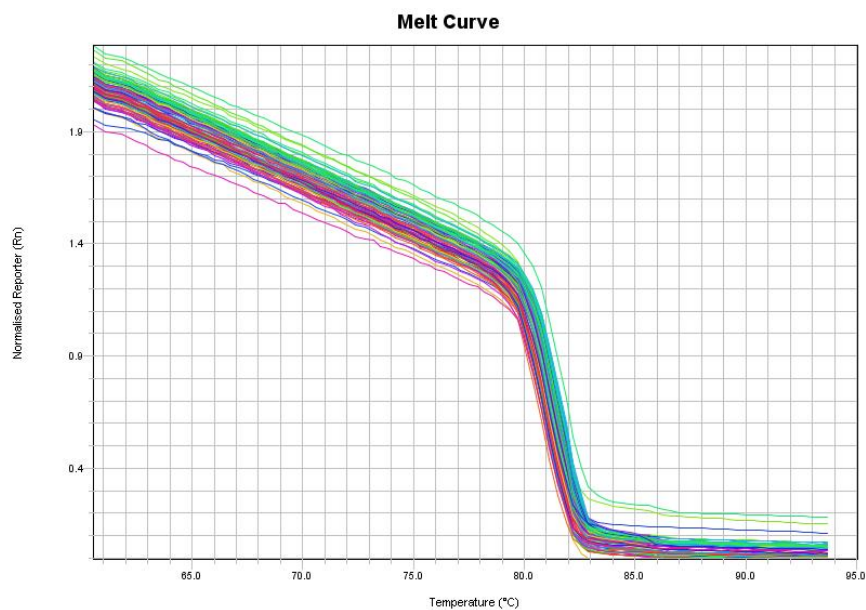
λόγω αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA είτε λόγω μικροδιαφορών στο πιπεττάρισμα κατά την προσθήκη γενετικού υλικού στην αντίδραση. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου και εκφράζονται σταθερά σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές συνθήκες (housekeeping genes). Η σύγκριση των Ct των γονιδίων-στόχων με τα αντίστοιχα των γονιδίων αναφοράς επιτρέπει τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων (σχετική ποσοτικοποίηση). Αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του παρακάτω μαθηματικού μοντέλου, που αποτελεί μια τροποποιημένη και βελτιωμένη μορφή του μοντέλου του Pfaffl (2001) για πολλαπλά γονίδια αναφοράς (Hellemans *et al.*, 2007):

$$R = \frac{(E \text{ γονιδίου στόχου})^{\Delta Ct \text{ γονιδίου αναφοράς (Μέσος όρος μάρτυρα - Μέσος όρος δείγματος)}}{f \sqrt{\prod_0^F (E \text{ γονιδίου αναφοράς})^{\Delta Ct \text{ γονιδίου αναφοράς } o (Μέσος όρος μάρτυρα - Μέσος όρος δείγματος)}}$$

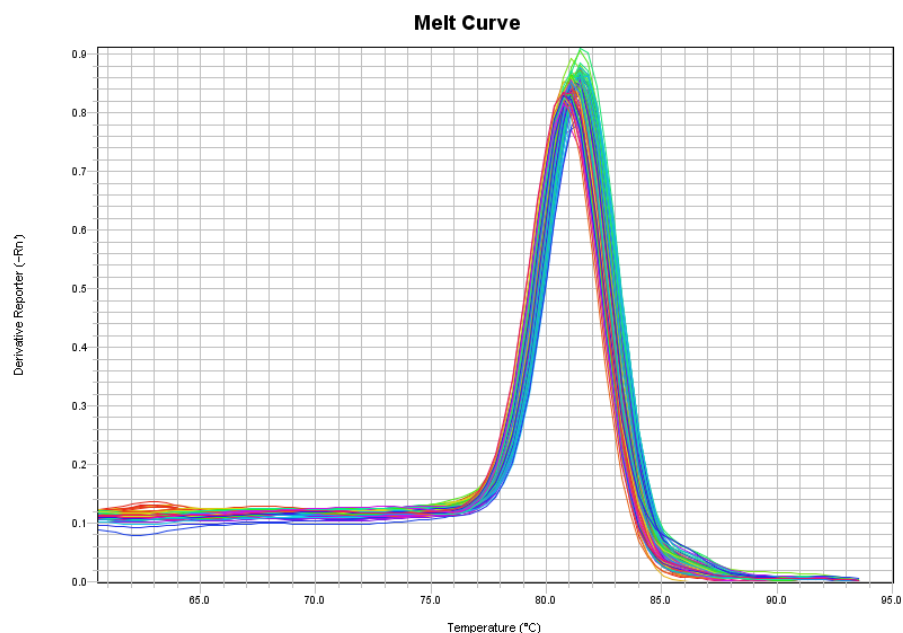
Όπου E (Efficiency): Αποδοτικότητα γονιδίου

VI. Καμπύλη αποδιάταξης (Melt curve)

Για τον έλεγχο της ειδικότητας της αντίδρασης, μετά την ολοκλήρωσή της πραγματοποιείται αναθέρμανση των δειγμάτων και λαμβάνεται η καμπύλη αποδιάταξης (Melting curve) των μορίων DNA (**Εικόνα 3.18**). Η τελευταία αποτελεί γραφική παράσταση του φθορισμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (°C), στην οποία φαίνεται η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) των προϊόντων από την απότομη μείωση του φθορισμού. Ταυτόχρονα λαμβάνεται η γραφική παράσταση του αρνητικού λόγου της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ($-\Delta F/\Delta T$) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (°C), που εμφανίζεται με τη μορφή κορυφών (**Εικόνα 3.19**). Κάθε κορυφή της καμπύλης αντιστοιχεί σε ένα προϊόν της αντίδρασης. Κορυφές που εμφανίζονται σε θερμοκρασία αποδιάταξης διαφορετική από αυτήν του γονιδίου-στόχου, δηλώνουν την παρουσία διμερών εκκινητών ή άλλων μη ειδικών προϊόντων που έχουν ανιχνευτεί.



Εικόνα 3.18: Καμπύλη αποδιάταξης.



Εικόνα 3.19: Καμπύλη $-\Delta F/\Delta T$ προς T ($^{\circ}\text{C}$).

VII. Εκτέλεση qPCR

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Σωλήνες τύπου erpendorf (0,2 mL και 0,5 mL)
- Πλάκες PCR 96 φρεατίων (Splash free support base SG 09 A5-1A), καλύμματα για τις πλάκες (Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) και εργαλείο επίστρωσης των καλυμμάτων (MicroAmp Adhesive Film Applicator, SG 13A7-3B)
- Μηχάνημα ανάδευσης vortex (Combi-spin, FVL 2400N, BioSan)
- Φυγόκεντρος (HERAEUS Biofuge Stratos, Thermo Scientific)

- Θερμικός κυκλοποιητής (SaCycler-96, Sacace Biotechnologies)

Αναλυτική πορεία:

Για την εκτέλεση της αντίδρασης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Fast Gene ICGreen 2 x qPCR Universal Mix, NIPPON Genetics.

1) Αρχικά παρασκευάστηκε το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.8**):

Πίνακας 3.8 : Ποσότητες ανά αντίδραση για την παρασκευή του master mix.

| Συστατικά | Όγκος (μL) | Τελική συγκέντρωση |
|------------------------------|------------|--------------------|
| H ₂ O (milli Q) | 9-(5+F+R) | |
| 2x FastGene IC Green mix | 5 | 1x |
| Forward Primer (F) (10μM) | 0,15 | 150 nM |
| | 0,2 | 200 nM |
| | 0,3 | 300 nM |
| Reverse Primer (R) (10μM) | 0,15 | 150 nM |
| | 0,2 | 200 nM |
| | 0,3 | 300 nM |
| Τελικός όγκος | 9 | |

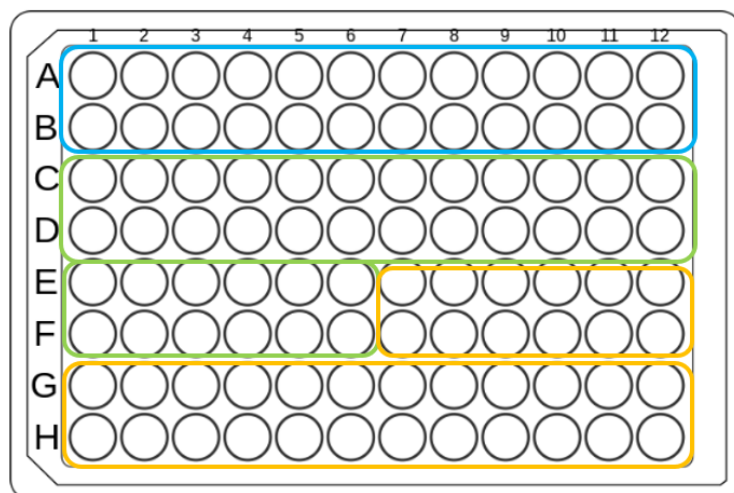
2) Τα δείγματα cDNA της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας αναδεύτηκαν με vortex και φυγοκεντρήθηκαν (spin down).

3) Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας PCR μεταφέρθηκαν 9 μL από το master mix και 1μL του cDNA (τελικός όγκος αντίδρασης 10 μL). Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές σε δύο φρεάτια της πλάκας για επαναληψιμότητα. Ο τρόπος τοποθέτησης των δειγμάτων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.20**. Ως Negative control (N) χαρακτηρίζονται τα κελιά με τον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης (9 μL Master Mix και 1μL H₂O) για κάθε γονίδιο.

4) Η πλάκα καλύφθηκε με ειδική διάφανη μεμβράνη και το κάλυμμα επιστρώθηκε στις άκρες με τη βοήθεια κατάλληλου πλαστικού εργαλείου.

5) Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 3-4 λεπτά ώστε να καθιζάνουν τυχόν σταγονίδια του δείγματος που έχουν προσκολληθεί στα τοιχώματα.

6) Τέλος η πλάκα μεταφέρθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή όπου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω συνθήκες θέρμανσης (**Πίνακας 3.9**):



Εικόνα 3.20: Τρόπος τοποθέτησης δειγμάτων μικροφυκών σε πλάκα 96-φρεατίων PCR. Μπλε: LPS/Negative control/ Blank, Πράσινο: δείγματα σπιρουλίνας (A και B), Πορτοκαλί: δείγματα χλωρέλλας (A και B). (Προσαρμοσμένο από Wikimedia commons, 2023).

Πίνακας 3.9: Στάδια και συνθήκες θέρμανσης κατά την qPCR.

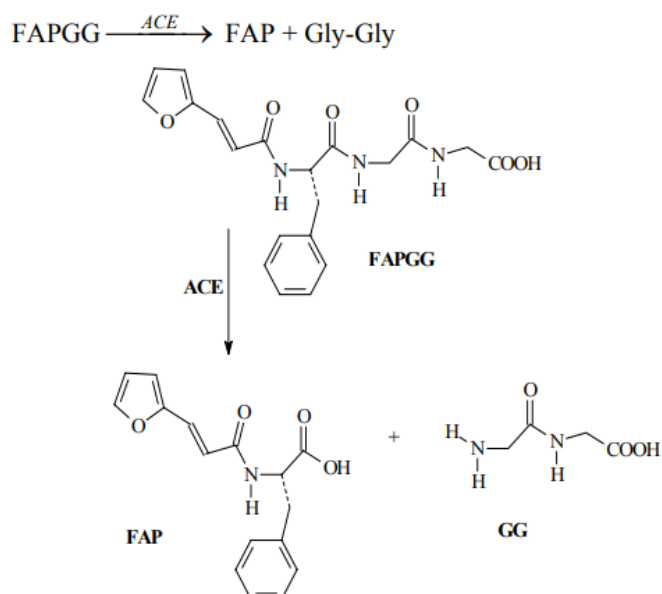
| Στάδια | Θερμοκρασία (°C) | Διάρκεια | Κύκλοι |
|------------------------------------|------------------|----------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη/ ενεργοποίηση | 95 | 2 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 95 | 5 sec | 40 |
| Υβριδισμός και επιμήκυνση | 60 | 20 sec | |
| Καμπύλη αποδιάταξης | 95 | 15 sec | 1 |
| | 60 | 1 min | |
| | 95 | 30 sec | |
| Ψύξη | 10 | | |

3.4. Μελέτη Αντιυπερτασικών ιδιοτήτων

Η μελέτη των αντιυπερτασικών ιδιοτήτων πραγματοποιήθηκε στα πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) που απομονώθηκαν ύστερα από *in vitro* πέψη των δειγμάτων επιδορπίου γιαουρτιού, σκέτου γιαουρτιού, βιομάζας της *Spirulina platensis* και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της, που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους. Η αντιυπερτασική δράση των πεπτιδικών κλασμάτων προσδιορίστηκε από την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου ACE σε υπόστρωμα furanacroyl-Phe-Gly-Gly (FAPGG) με τη φωτομετρική μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω.

3.4.1. Προσδιορισμός ανασταλτικής δράσης κατά του ενζύμου ACE σε υπόστρωμα FAPGG

Η μέθοδος στηρίζεται στη χημική αντίδραση μεταξύ του ενζύμου ACE και του υποστρώματος N-[3-(2-furyl)-acryloyl]-L-phenylalanine-glycyl-glycine (FAPGG), κατά την οποία το ACE καταλύει την υδρόλυση του FAPGG στο αμινοξύ FA-Phe και το διπεπτίδιο Gly-Gly (**Εικόνα 3.21**). Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι, με την πάροδο του χρόνου, να προκαλείται μείωση της απορρόφησης (που μετριέται στα 340 nm) των τελικών προϊόντων σε σχέση με το αρχικό υπόστρωμα. Έτσι, η δραστηριότητα του ACE προσδιορίζεται απευθείας από το ρυθμό μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm, κατά τα πρώτα 30 λεπτά της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία των πεπτιδικών κλασμάτων κάθε δείγματος, ως πιθανοί αναστολείς της δράσης του, σε σχέση με την απουσία τους, καθορίζει τον βαθμό αναστολής του ενζύμου από τα πεπτιδικά κλάσματα και συνεπώς την αντιυπερτασική τους ιδιότητα. Η συνεχής κινητική αυτή μέθοδος με χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ACE, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Holmquist *et al.* (1979). Έκτοτε έχει υποστεί τροποποιήσεις για τη χρήση του FAPGG ως υπόστρωμα για τον έλεγχο βιοενεργών πεπτιδίων και αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο (Murray & FitzGerald, 2004; Shalaby *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2017). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη στηρίχτηκε στις μεθόδους που περιέγραψαν οι Murray & FitzGerald (2004), Shalaby *et al.* (2006), Ahmad *et al.* (2007), Otte *et al.* (2007), Pihlanto & Korhonen (2010), Henda *et al.* (2013) Giromini *et al.* (2017), Ye *et al.* (2022) και Sangsawad *et al.* (2022), με ορισμένες τροποποιήσεις όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 3.21: Υδρόλυση του υποστρώματος FAPGG από το ένζυμο ACE (Tomovska *et al.* 2013)

Απαιτούμενα αντιδραστήρια:

- Διάλυμα υποστρώματος: FAPGG (F7131, Sigma-Aldrich) (0,88 mM) διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl (50 mM), pH 7,5 και 0,3 M NaCl
- Διάλυμα ενζύμου: ACE από πνεύμονα κουνελιού 0,1 Units/ml νερού (A6778, Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) χωρίς υπόστρωμα: 50 mM-tris-HCl, pH 7,5 και 0,3 M NaCl
- Καπτοπρίλη διαλυμένη σε νερό (1mM) (Sigma-Aldrich)

Απαιτούμενα όργανα και εξοπλισμός:

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου, πιπέτα 8 καναλιών και ρύγχη
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-φρεατίων
- Φασματοφωτόμετρο σάρωσης μικροπλακών (Biotech Epoch 2)

Αναλυτική πορεία:

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-φρεατίων. Αρχικά, σε κάθε φρεάτιο ξεχωριστά προστέθηκαν 13,5 μl πεπτιδικού κλάσματος (5mg /mL) των δειγμάτων και στη συνέχεια 100 μl από προθερμασμένο (37 °C, 15 min) διάλυμα υποστρώματος. Η πλάκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37 °C και ακολούθησε η προσθήκη 10 μl του ενζυμικού διαλύματος με αποτέλεσμα να ξεκινήσει η αντίδραση. Η πλάκα μεταφέρθηκε αμέσως στο φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στους 37 °C και στα 340 nm. Η καταγραφή της απορρόφησης πραγματοποιούνταν κάθε 1 λεπτό για 30 λεπτά. Η κλίση της καμπύλης απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο αποτέλεσε άμεσο μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας και λήφθηκε

για ένα γραμμικό διάστημα 15 λεπτών (5-20 λεπτά της αντίδρασης) της καμπύλης. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο αξιοπιστίας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η αντιυπερτασική ουσία, καπτοπρίλη, σε συγκεντρώσεις 2,5, 5, 10 και 20nm ενώ ως αρνητικός μάρτυρας το διάλυμα (buffer) (απουσία αναστολέα) τα οποία προστέθηκαν σε ξεχωριστά φρεάτια αντί για τα πεπτιδικά κλάσματα. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Η αναστολή του ACE (%) υπολογίστηκε από το πηλίκο της κλίσης παρουσία αναστολέα (Slope αναστολέα) προς την κλίση που λήφθηκε σε απουσία αναστολέα-αρνητικός μάρτυρας (Slope απουσία αναστολέα) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Αναστολή ACE (\%)} = [1 - (\text{Slope αναστολέα} / \text{Slope απουσία αναστολέα})] \times 100$$

3.5. Επεξεργασία Δεδομένων και Στατιστική Ανάλυση

Η επεξεργασία των δεδομένων καθώς και τα γραφήματα διαλυτότητας σιδήρου πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων της qPCR, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των διαφορετικών τιμών Ct κάθε δείγματος, ο οποίος κανονικοποιήθηκε ως προς την αντίστοιχη Ct τιμή του γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) με σχετική ποσοτικοποίηση και τα δεδομένα παρουσιάστηκαν σε μορφή διαγράμματος. Ως μέθοδος κανονικοποίησης ως προς πολλαπλά γονίδια αναφοράς, εφαρμόστηκε το τροποποιημένο μοντέλο του Pfaffl (2001) (Hellemans *et al.*, 2007) όπως αναφέρεται και στην ενότητα 3.3.4.6., υποενότητα V.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων της qPCR και ACE-αναστολής (%) διεξήχθη με χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics 26 και με εφαρμογή της ανάλυσης one-way ANOVA. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± τυπικό σφάλμα μέσου. Ο έλεγχος κανονικότητας της κατανομής πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή Kolmogorov-Smirnov, ενώ για τη σύγκριση των μέσων όρων των δειγμάτων και τον εντοπισμό των ομάδων που παρουσιάζουν διαφορές (post hoc test) εφαρμόστηκε η δοκιμή Tukey HSD. Ο έλεγχος ομοιογένειας της διασποράς μεταξύ των συγκρινόμενων δειγμάτων διεκπεραιώθηκε με Levene test. Στις περιπτώσεις παραβίασης της υπόθεσης ομοιογένειας των διακυμάνσεων, εφαρμόστηκε η δοκιμή Games-Howell (post-hoc test) που παρέχει διαστήματα εμπιστοσύνης για τις διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των δειγμάτων και δείχνει αν οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές (Templeton, 2011). Η διαφορά μεταξύ των επιπέδων σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0,05$. Τέλος, η επεξεργασία των διαγραμμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος GraphPad Prism 8.4.3.

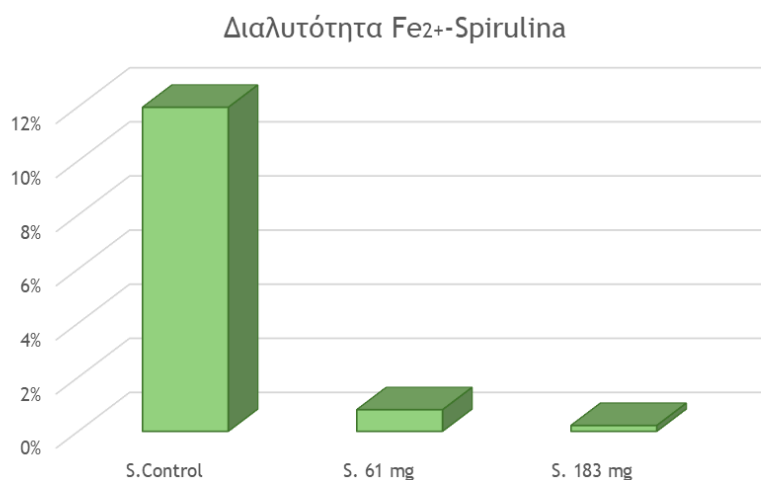
Κεφάλαιο 4ο

Αποτελέσματα

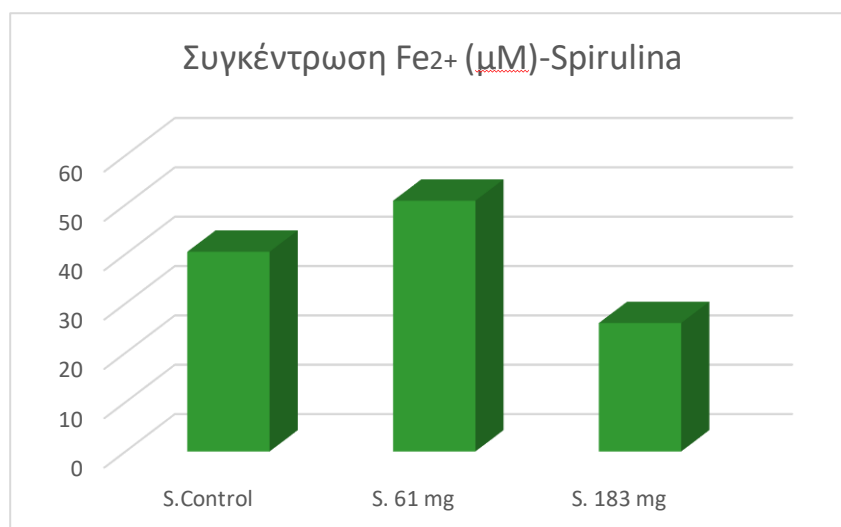
4.1. Αποτελέσματα διαλυτότητας δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) μικροφυκών

Η διαλυτότητα του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) προσδιορίστηκε στο υπερκείμενο των φυγοκεντρημένων προϊόντων πέψης όλων των δειγμάτων μικροφυκών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (Control, 61 mg Fe/ L και 183 mg Fe/ L) . Επιπλέον, για τη λήψη των αποτελεσμάτων προσδιορίστηκε και η συγκέντρωση (μM) του δισθενούς σιδήρου στα υπερκείμενα των πευθέντων προϊόντων, με τη μέθοδο της φερροζίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω υπό τη μορφή διαγραμμάτων για κάθε είδος μικροφύκους.

4.1.1. Αποτελέσματα για *Spirulina platensis*



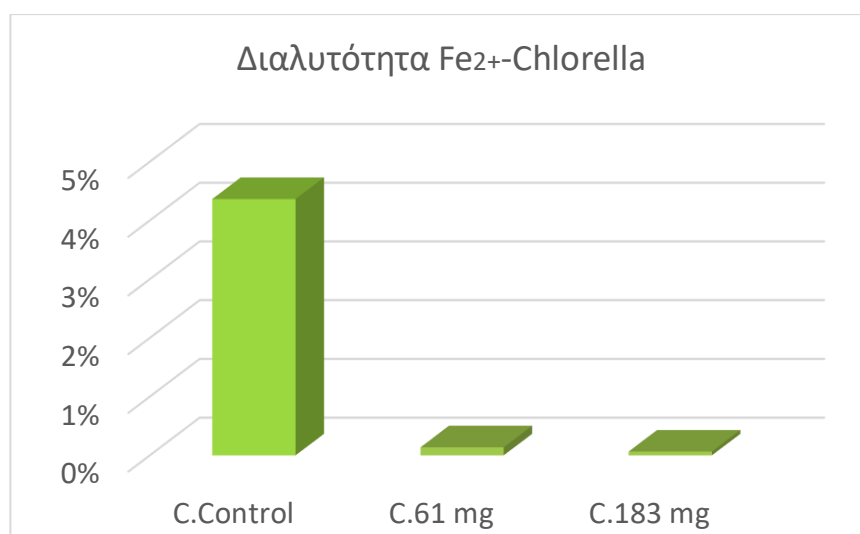
Διάγραμμα 4.1: Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) (%) στα δείγματα της *Spirulina platensis*.



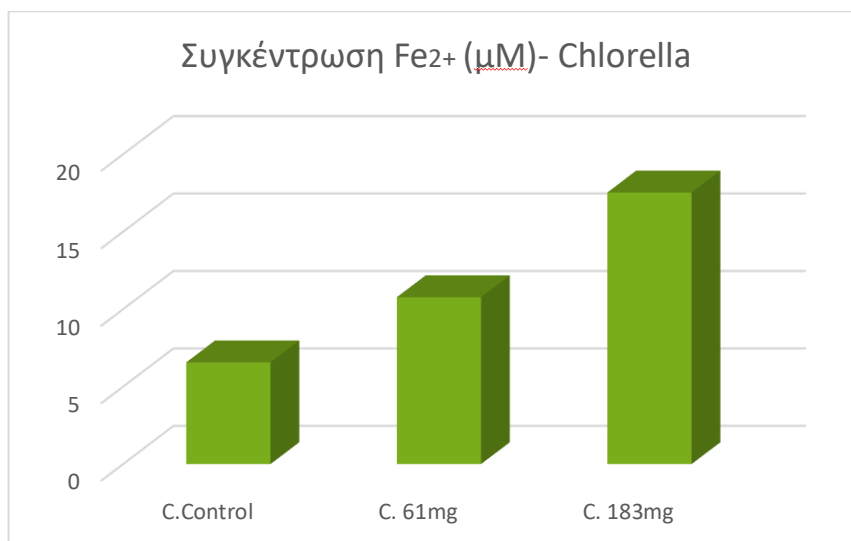
Διάγραμμα 4.2: Συγκέντρωση (μM) δισθενούς σιδήρου (Fe²⁺) στα δείγματα της *Spirulina platensis*.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, τα εμπλουτισμένα με σίδηρο δείγματα της *Spirulina platensis* (61 mg Fe/ L και 183 mg Fe/ L) παρά την αυξημένη συγκέντρωση ολικού σιδήρου αλλά και δισθενούς σιδήρου, για το δείγμα S. 61mg, (Διάγραμμα 4.2) παρουσιάζουν αρκετά μειωμένη διαλυτότητα συγκριτικά με το μη εμπλουτισμένο δείγμα (Control) (Διάγραμμα 4.1). Επιπλέον, στο Διάγραμμα 4.2 φαίνεται ότι το δείγμα S. 183 mg που διαθέτει το μεγαλύτερο εμπλουτισμό σε ολικό σίδηρο, εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση δισθενούς σιδήρου σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα. Η απώλεια αυτή πιθανόν να οφείλεται σε μεταφορά μέρους του σιδήρου στο ίζημα του δείγματος κατά τη φυγοκέντρωση.

4.1.2. Αποτελέσματα για *Chlorella vulgaris*



Διάγραμμα 4.3: Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) (%) στα δείγματα της *Chlorella vulgaris*.



Διάγραμμα 4.4: Συγκέντρωση (μM) δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στα δείγματα της *Chlorella vulgaris*.

Ομοίως με τα αποτελέσματα διαλυτότητας της *Spirulina platensis*, τα δείγματα της *Chlorella vulgaris* C. 61mg και C.183mg παρά την ανοδική αύξηση στη συγκέντρωση δισθενούς σιδήρου σε σχέση με το Control (**Διάγραμμα 4.4**), εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη διαλυτότητα από αυτό (**Διάγραμμα 4.3**). Συγκρίνοντας τα δύο είδη μικροφυκών από τα διαγράμματα προκύπτει πως το μη εμπλουτισμένο δείγμα της *Spirulina platensis* (Control) εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου από το αντίστοιχο δείγμα της *Chlorella vulgaris* με διαφορά 7,3%.

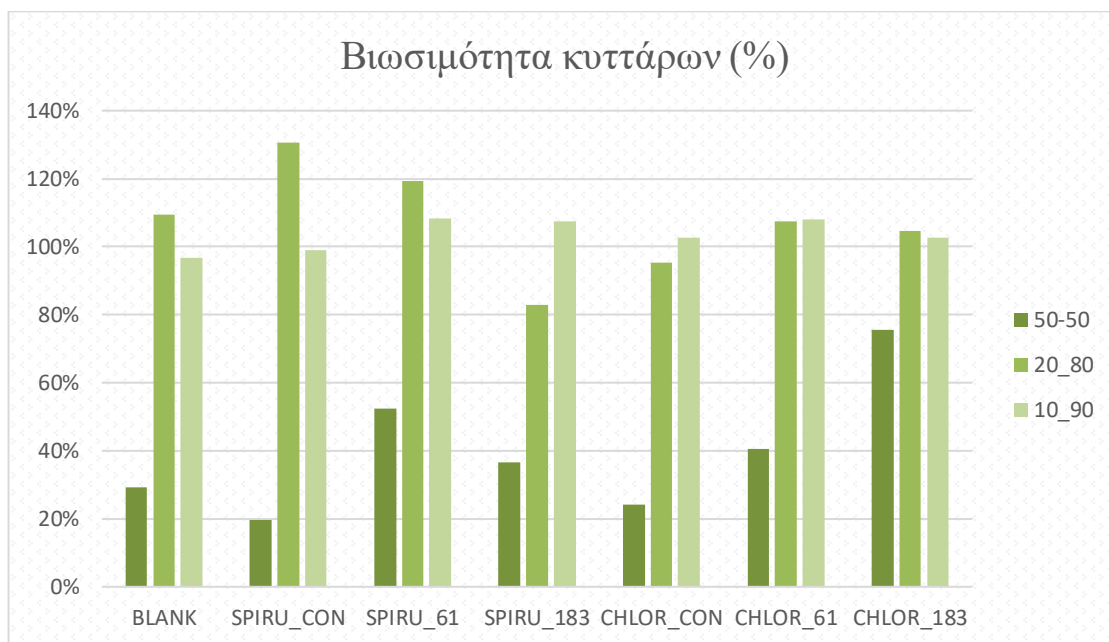
4.2. Αποτελέσματα δοκιμής MTT

Με τη δοκιμή MTT προσδιορίστηκε το ποσοστό βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς THP-1, ύστερα από την έκθεσή της για 24 ώρες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των πεπτιδικών κλασμάτων, μεγέθους < 3 kDa, που απομονώθηκαν από τα δείγματα μικροφυκών και επιδορπίων γιαουρτιού. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας εκφρασμένα σε % ως προς τις μετρήσεις των κυττάρων που δεν εκτέθηκαν σε δείγματα.

4.2.1. Αποτελέσματα βιωσιμότητας κυττάρων ύστερα από έκθεση σε πεπτιδικά κλάσματα μικροφυκών

Η έκθεση των κυττάρων στα πεπτιδικά κλάσματα των μικροφυκών πραγματοποιήθηκε σε αναλογίες 10% (10 μL κλάσμα πεπτιδίων/ 90 μL θρεπτικού υλικού ή 10_90), 20% (20_80) και

50% (50_50) της αρχικής συγκέντρωσης πεπτιδίων στα δείγματα (40 mg πρωτεΐνης/mL), όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.5).



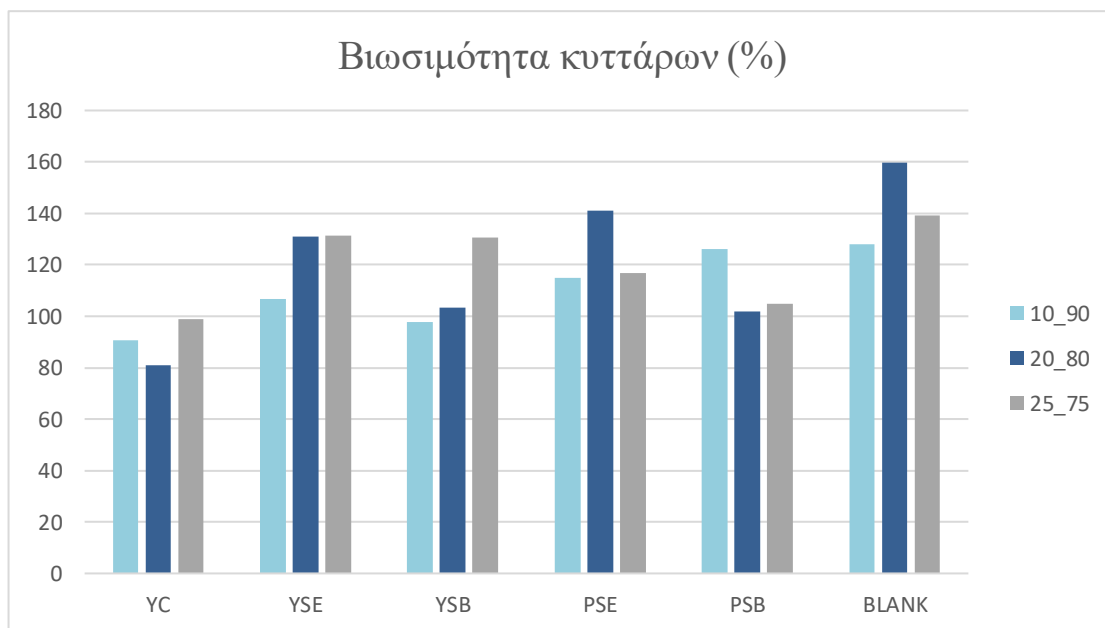
Διάγραμμα 4.5: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα των δειγμάτων μικροφυκών και αρνητικού μάρτυρα της πέψης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90), 20% (20_80) και 50% (50_50).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, χαμηλότερη βιωσιμότητα για το σύνολο των δειγμάτων παρουσιάζουν τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ποσοστό 50% των πεπτιδικών κλασμάτων, με τη βιωσιμότητα να παίρνει τιμές 20-76%. Η έκθεση των κυττάρων σε ποσοστό 20% των πεπτιδικών κλασμάτων, εμφανίζει διακυμάνσεις στη βιωσιμότητα μεταξύ των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, στα δείγματα SPIRU_CON και SPIRU_61 η βιωσιμότητα ξεπερνά αρκετά το ποσοστό 100% (130% και 120% αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα SPIRU_183 και CHLOR_CON υποπίπτει αυτής της τιμής (83% και 95% αντίστοιχα). Τέλος, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ποσοστό 10% των πεπτιδικών κλασμάτων επιδεικνύουν σχετική σταθερότητα στις τιμές βιωσιμότητας, οι οποίες κυμαίνονται από 97% έως 108%.

4.2.2. Αποτελέσματα βιωσιμότητας κυττάρων ύστερα από έκθεση σε πεπτιδικά κλασματα γιαουρτιού, επιδορπίων γιαουρτιού, βιομάζας και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της *Spirulina platensis*

Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα πεπτιδικά κλάσματα των δειγμάτων YC, YSB, YSE, PSE, PSB και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης BLANK, σε αναλογίες 10% (10 μL κλάσμα πεπτιδίων/ 90 μL θρεπτικού υλικού ή 10_90), 20% (20_80) και 25% (25_75), της αρχικής συγκέντρωσης πεπτιδίων στα δείγματα (40 mg πρωτεΐνης/mL), για τον έλεγχο της βιωσιμότητάς τους. Τα

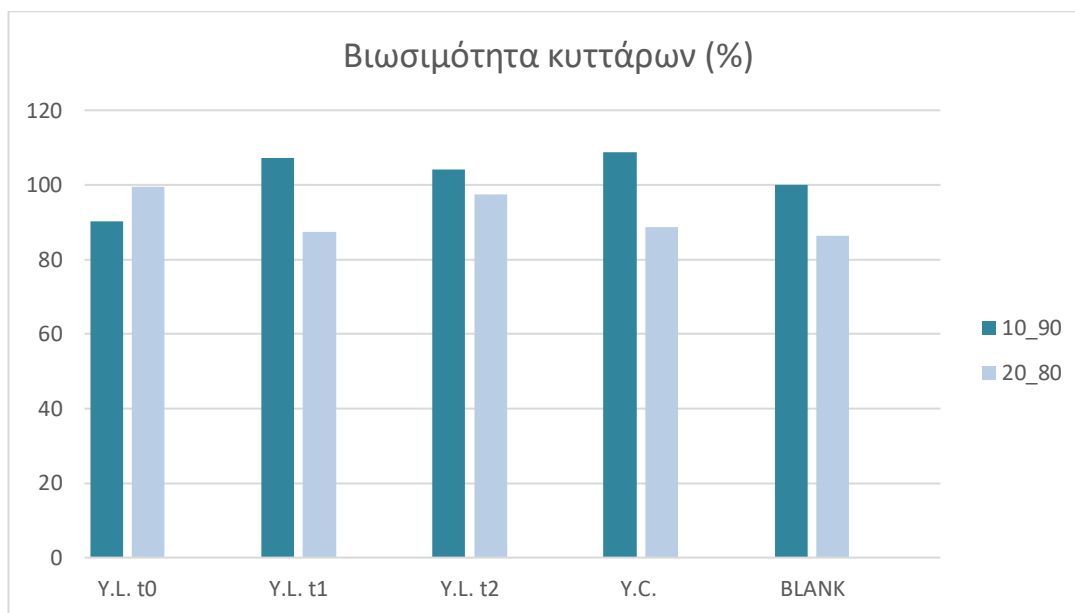
αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (**Διάγραμμα 4.6**) σύμφωνα με το οποίο σε όλα τα δείγματα και οι τρεις αναλογίες εκδήλωσαν υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας κυττάρων με τιμές που κυμαίνονται από 80% (YC-10%) έως 159% (BLANK 20%). Ωστόσο, στη πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε η αναλογία 10% για όλα τα δείγματα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα των μικροφυκών στα οποία η βέλτιστη βιωσιμότητα παρατηρήθηκε σε αυτό το ποσοστό.



Διάγραμμα 4.6: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB), πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE) καθώς και του αρνητικού μάρτυρα της πένης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90), 20% (20_80) και 25% (25_75).

Επιπλέον, τα κύτταρα εκτέθηκαν στα πεπτιδικά κλάσματα των δειγμάτων Y.L. με διαφορετικούς χρόνους διατήρησης υπό ψύξη (4 °C) ($t_0 = 0$ ημέρες, $t_1 = 14$ ημέρες, $t_2 = 28$ ημέρες) καθώς και στα δείγματα Y.C. και BLANK ως αρνητικοί μάρτυρες, σε αναλογίες 10% (10 μ L κλάσμα πεπτιδίων/ 90 μ L θρεπτικού υλικού ή 10_90), και 20% (20_80) της αρχικής συγκέντρωσης πεπτιδίων στο προϊόν πένης. Τα αποτελέσματα βιωσιμότητας που παρουσιάζονται στο διάγραμμα (**Διάγραμμα 4.7**) δείχνουν πως η έκθεση των κυττάρων σε όλα τα δείγματα έδειξε ικανοποιητικό ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων (> 80%). Συγκρίνοντας τις δύο αναλογίες, η αναλογία 10% έδειξε μεγαλύτερη βιωσιμότητα σε σχέση με την αναλογία 20% σε όλα τα δείγματα με εξαίρεση το δείγμα Y.L. t_0 όπου ήταν ελαφρώς

χαμηλότερη (κατά 9%). Έτσι, η αναλογία 10% επιλέχθηκε για εφαρμογή στην τελική πειραματική διαδικασία και για τα δείγματα Y.L.



Διάγραμμα 4.7: Βιωσιμότητα THP-1 κυττάρων ύστερα από έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (Y.L.) και με διαφορετικούς χρόνους διατήρησης (t0, t1, t2), σκέτου γιαουρτιού (YC) καθώς και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (BLANK) σε ποσοστά 10% (10_90) και 20% (20_80).

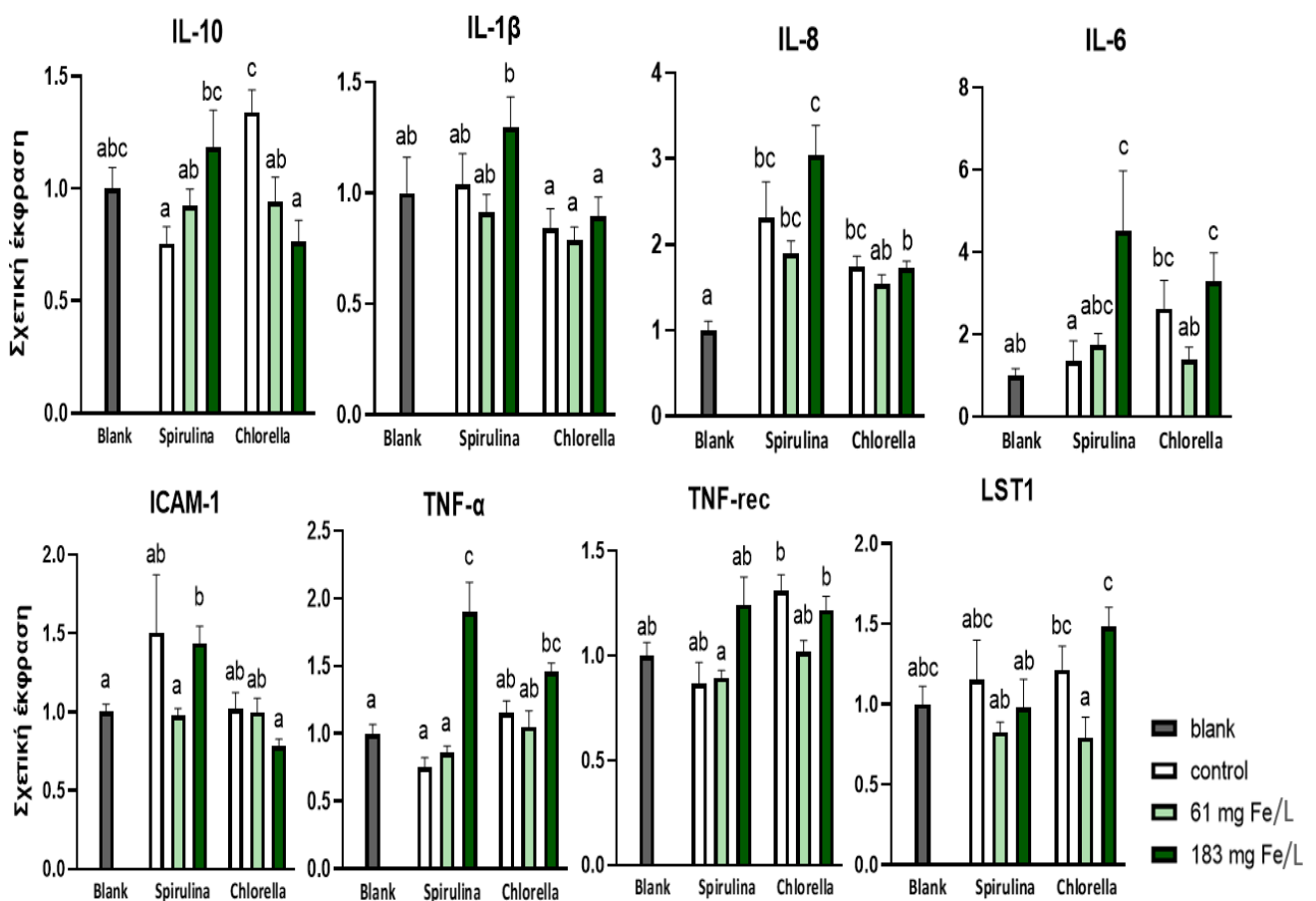
4.3. Αποτελέσματα Real Time PCR

Με τη μέθοδο Real Time PCR εξετάστηκαν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ορισμένων κυτοκινών και παραγόντων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης (IL-1β, IL-10, IL-6, IL-8, IL-12β, TNF-α, TNF-rec, MMP9, ICAM-1, MyD88, MCP-1, LST1, TGF-β), του ενζύμου COX-2, και των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, NF-κB-Rela, STAT1, STAT2, IRF5, TLR2 και TLR4 που συμμετέχουν στο μονοπάτι παραγωγής των παραπάνω κυτοκινών. Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε LPS- ενεργοποιημένα μακροφάγα κύτταρα THP-1, ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης των μικροφυκών: *Arthrospira (Spirulina) platensis* και *Chlorella vulgaris*, καθώς και προϊόντων επιδορπίων γιαουρτιού με προσθήκη συστατικών (πρωτεΐνες, λιπίδια) της *Arthrospira (Spirulina) platensis*, συγκριτικά με την απουσία έκθεσης σε αυτά. Δείγματα-αναφοράς (Control) αποτέλεσαν και στις δύο περιπτώσεις τα LPS- ενεργοποιημένα μακροφάγα που δεν εκτέθηκαν στα δείγματα. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων (άξονας Y) σε συνάρτηση με τις διαφορετικές περιπτώσεις (άξονας X)

για κάθε κατηγορία δείγματος (μικροφύκη, επιδόρπια γιαουρτιών) καθώς και για τον αρνητικό μάρτυρα της πέψης (blank). Οι διαφορετικές περιπτώσεις διακρίνονται με διαφορετικό χρώμα όπως φαίνεται παρακάτω, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των αποτελεσμάτων έκφρασης του ίδιου γονιδίου παρουσιάζονται με διαφορετικά λατινικά γράμματα.

4.3.1. Αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης κυττάρων ύστερα από έκθεση σε προϊόντα πέψης μικροφυκών

Στα παρακάτω διαγράμματα η σχετική έκφραση κάθε γονιδίου παρουσιάζεται σε συνάρτηση με τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων (control, 61 mg Fe και 183 mg Fe) των μικροφυκών *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris*, καθώς και του αρνητικού μάρτυρα (blank). Συγκρίνοντας τις περιπτώσεις αυτές για κάθε είδος μικροφυκιού φαίνεται πως η έκθεση των κυττάρων στο δείγμα S.183 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου IL-10 (Διάγραμμα 4.8) σε σχέση με το δείγμα S.C. Αντιθέτως, στην περίπτωση της χλωρέλλας, τα δείγματα C.183 και C.61 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση της IL-10 συγκριτικά με το δείγμα C.C.



Διάγραμμα 4.8: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-10, IL-1β, IL-8, IL-6, ICAM-1, TNF-a, TNF-rec και LST1 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της *Spirulina platensis* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και *Chlorella vulgaris* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe).

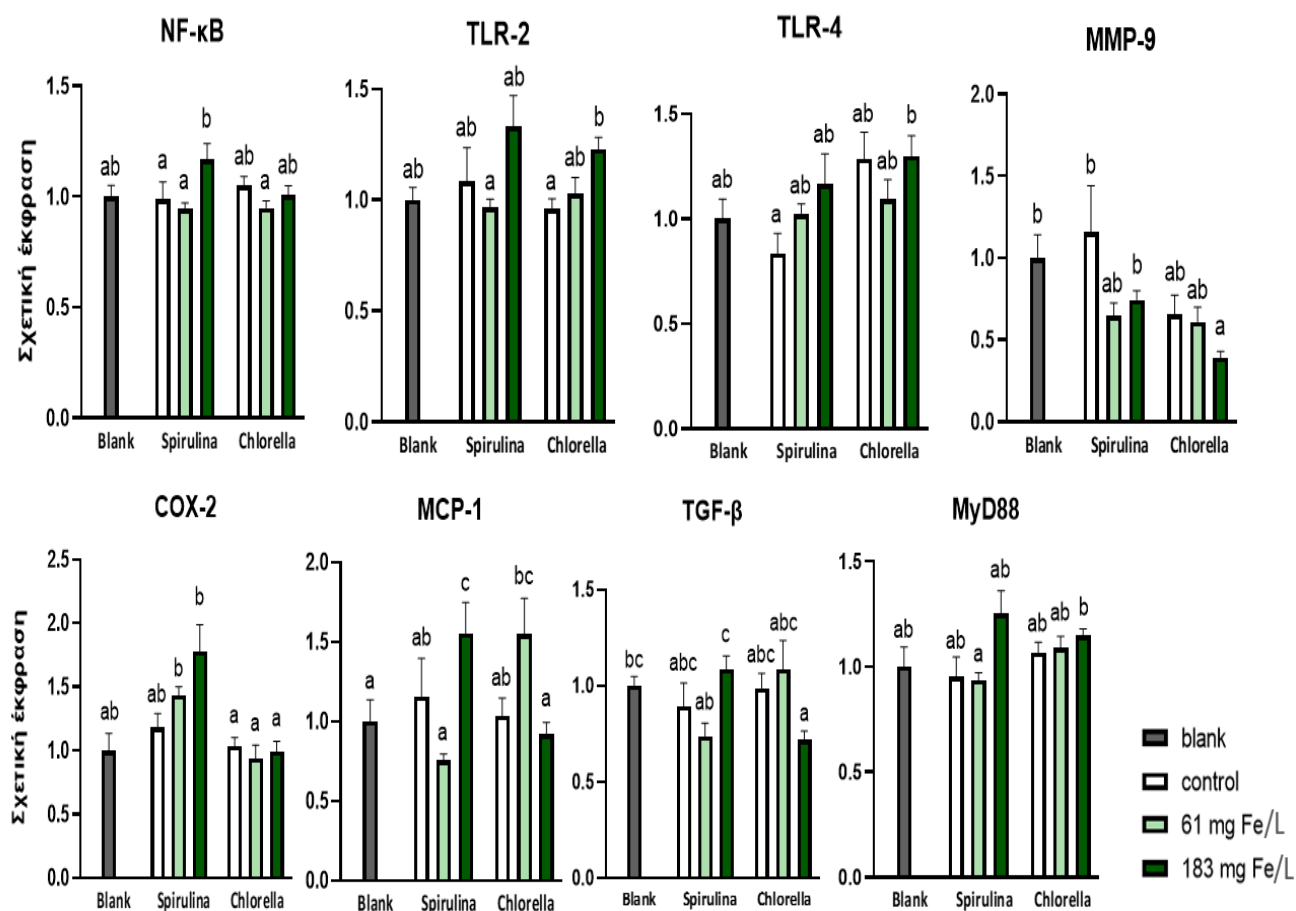
Όσον αφορά την έκφραση της IL-8, παρόλο που στην περίπτωση της σπιρουλίνας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, στη χλωρέλλα το δείγμα C.183 εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου σε σχέση με το δείγμα C.61.

Ομοίως επηρεάστηκε και η έκφραση του γονιδίου IL-6 στην περίπτωση της χλωρέλλας, ενώ στη σπιρουλίνα η γονιδιακή έκφραση έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο δείγμα S.183 σε σχέση με το δείγμα S.C.

Επιπλέον, η έκφραση των γονιδίων ICAM-1 και TNF-a φαίνεται πως δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της χλωρέλλας, ενώ από τα δείγματα της σπιρουλίνας το δείγμα S.183 εμφάνισε στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων σε σχέση με το δείγμα S.61. Εκτός από αυτό, το δείγμα S.183 παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση του TNF-a και σε σχέση με το δείγμα S.C.

Παρατηρώντας το διάγραμμα του γονιδίου LST1 φαίνεται πως παρόλο που τα δείγματα της σπιρουλίνας δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς την έκφραση του γονιδίου, στη χλωρέλλα το δείγμα C.61 εκδήλωσε στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση του γονιδίου τόσο σε σχέση με το δείγμα C.C. όσο και σε σχέση με το C.183.

Η σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1β και TNF-rec δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές εντός των δειγμάτων των δύο μικροφυκών ξεχωριστά. Αντίστοιχα, σύμφωνα με το **Διάγραμμα 4.9**, τόσο μεταξύ των δειγμάτων της σπιρουλίνας όσο και της χλωρέλλας δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων MMP9, MyD88, COX-2, και TLR4.



Διάγραμμα 4.9: Σχετική έκφραση των γονιδίων MMP9, MyD88, MCP-1, TGF-β, του ενζύμου COX-2, και των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, TLR2 και TLR4 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της *Spirulina platensis* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και *Chlorella vulgaris* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe).

Η έκφραση των γονιδίων NF-κB και TGF-B, όπως προκύπτει από το **Διάγραμμα 4.9**, επίσης δεν εκδήλωσε διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της χλωρέλλας. Ωστόσο, αυτό φαίνεται να μην ισχύει για τα δείγματα της σπιρουλίνας, όπου η έκφραση του γονιδίου TGF-B για το δείγμα S.183 αυξήθηκε σημαντικά συγκριτικά με το δείγμα S.61, καθώς και συγκριτικά με το δείγμα S.C. όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου NF-κB.

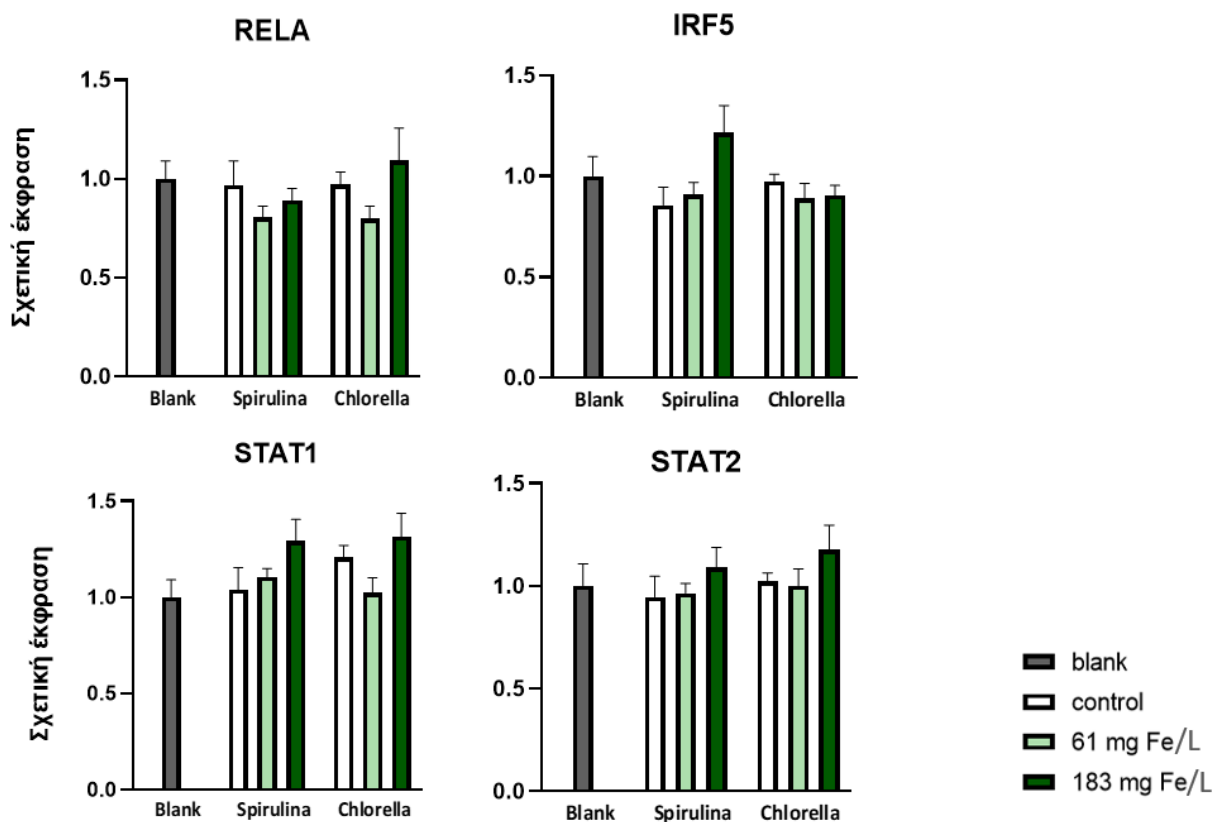
Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως κανένα από τα δείγματα της σπιρουλίνας δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ τους ως προς την έκφραση του υποδοχέα TLR2, κάτι το οποίο δεν ισχύει για τα δείγματα της χλωρέλλας καθώς το δείγμα C.183 σημαντικά αυξημένη έκφραση σε σχέση με το δείγμα C.C.

Αντίθετα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μικροφυκών παρουσίασε η έκφραση της χημειοκίνης MCP-1, όπου στη περίπτωση της σπιρουλίνας το δείγμα S.183 εμφάνισε αυξημένη έκφραση

σε σχέση με τα δείγματα S.61 και S.C., ενώ στη περίπτωση της χλωρέλλας το ίδιο δείγμα παρουσίασε μειωμένη έκφραση της χημειοκίνης σε σχέση με το δείγμα S.61.

Συγκρίνοντας τη σχετική έκφραση των δειγμάτων μικροφυκών με την αντίστοιχη του μάρτυρα της πέψης (Blank), φαίνεται πως τα δείγματα S.C., S.61, S.183, C.C. και C.183 εκδήλωσαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση της IL-8. Ομοίως, αύξηση σε σχέση με το Blank έδειξαν τα δείγματα S.183 και C.183 στην έκφραση των γονιδίων IL-6 και TNF- α (Διάγραμμα 4.8). Τα δείγματα της σπιρουλίνας S.61 και S.183 επίσης παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση του MCP-1 (Διάγραμμα 4.9). Αντιθέτως, το δείγμα της χλωρέλλας C.183 προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση των γονιδίων MMP-9 και TGF- β σε σχέση με το Blank (Διάγραμμα 4.9).

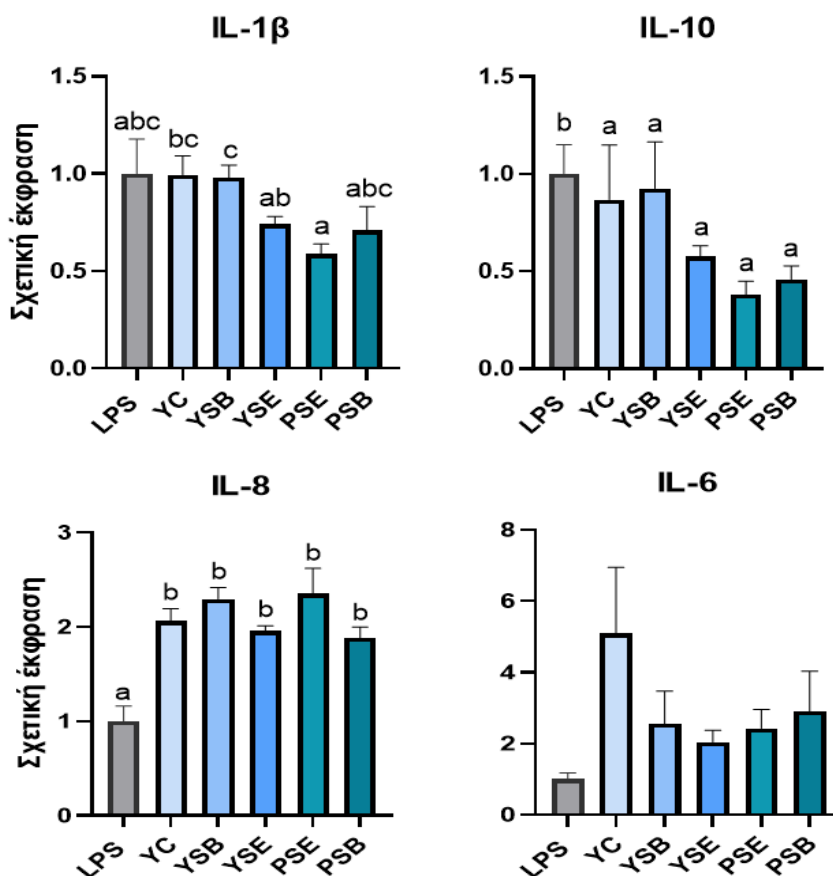
Τέλος, στο Διάγραμμα 4.10 παρουσιάζονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των δειγμάτων των δύο μικροφυκών όσο και σε σχέση με το Blank.



Διάγραμμα 4.10: Σχετική έκφραση των γονιδίων NF- κ B-Rela, IRF5, STAT1 και STAT2, από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης της *Spirulina platensis* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe) και *Chlorella vulgaris* (control, 61 mg Fe, 183 mg Fe).

4.3.2. Αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης κυττάρων ύστερα από έκθεση σε προϊόντα πέψης γιαουρτιού, επιδορπίων γιαουρτιού, βιομάζας και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της *Spirulina platensis*

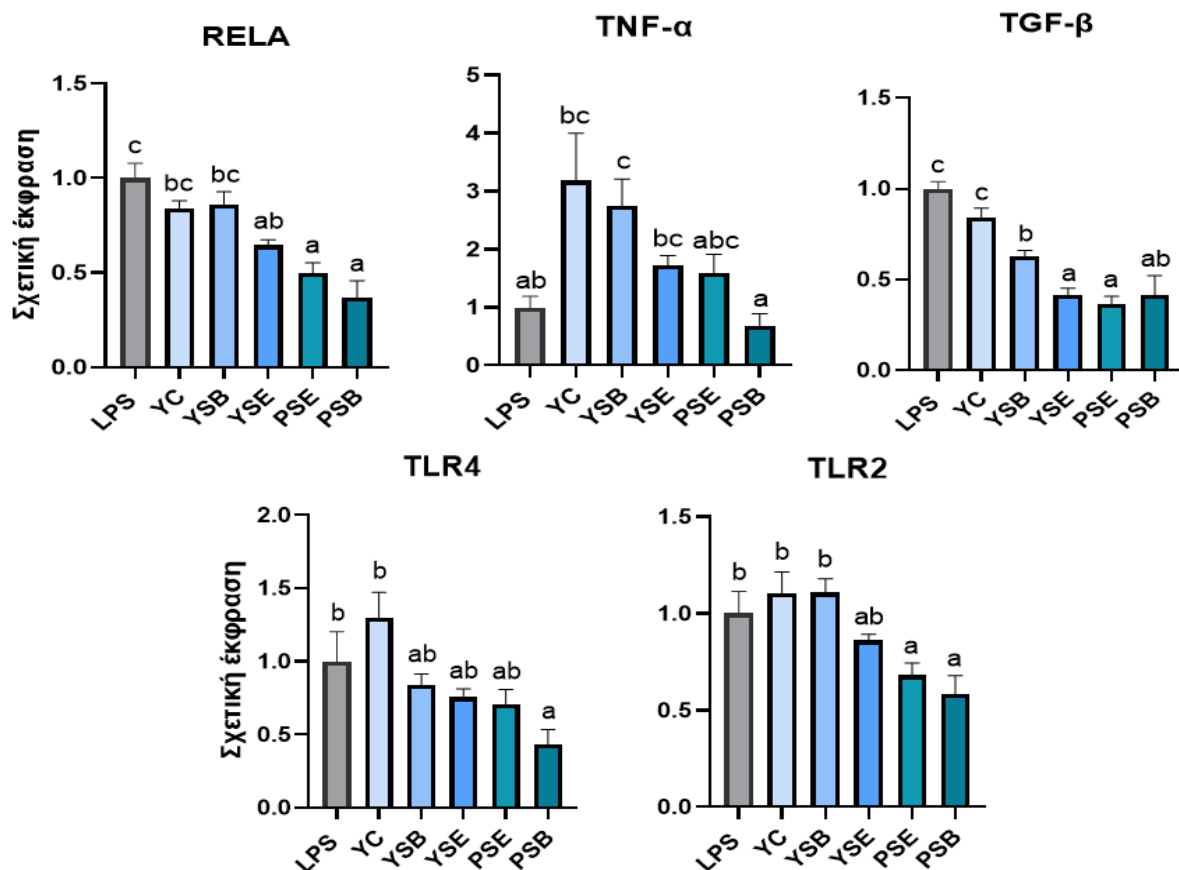
Στα διαγράμματα που ακολουθούν η σχετική έκφραση κάθε γονιδίου παρουσιάζεται σε συνάρτηση με την έκθεση των κυττάρων στα πεπτιδικά κλάσματα προϊόντων πέψης των δύο κατηγοριών επιδορπίων γιαουρτιού (YSB και YSE), σκέτου γιαουρτιού (YC), βιομάζας (σκόνη) της σπιρουλίνας (PSB) καθώς και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της (PSE). Επιπλέον, παρουσιάζεται η έκφραση των γονιδίων των LPS-ενεργοποιημένων κυττάρων που δεν εκτέθηκαν σε κάποιο προϊόν πέψης (LPS). Έτσι, από τα διαγράμματα των ιντερλευκινών (Διάγραμμα 4.11) φαίνεται πως η έκφραση της IL-10 παρουσίασε μείωση σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων συγκριτικά με το LPS, χωρίς τα δείγματα να παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους. Αντιθέτως, στην περίπτωση της IL-8 όλα τα δείγματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με το LPS. Στην έκφραση της ιντερλευκίνης IL-6 δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα δείγματα, ενώ η έκθεση των κυττάρων στο δείγμα YSB προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της IL-1β σε σχέση με το δείγμα YSE, χωρίς να διαφέρει η έκφραση των δύο δειγμάτων με αυτή του YC και του LPS.



Διάγραμμα 4.11: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1β, IL-10, IL-8 και IL-6 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB) καθώς και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE).

Σύμφωνα με το διάγραμμα έκφρασης του γονιδίου NF-kB-Rela (**Διάγραμμα 4.12**), το δείγμα YSE προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης σε σχέση με το δείγμα LPS. Ομοίως επηρεάστηκε και η έκφραση στην περίπτωση των δειγμάτων PSE και PSB. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση του NF-kB-Rela παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στο δείγμα PSB σε σχέση με το YSB. Το δείγμα YSB έδειξε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του TNF-α σε σχέση με το LPS.

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου TGF-β, το δείγμα YSB εμφάνισε σημαντικά μειωμένη έκφραση και των δύο γονιδίων σε σχέση με τα δείγματα LPS και YC, ενώ το δείγμα YSE παρουσίασε μειωμένη έκφραση συγκριτικά και με τις τρεις περιπτώσεις δειγμάτων (LPS, YC και YSB). Επιπλέον, μειωμένη έκφραση των γονιδίων σε σχέση με το LPS φαίνεται να έχουν τα δείγματα PSE και PSB.



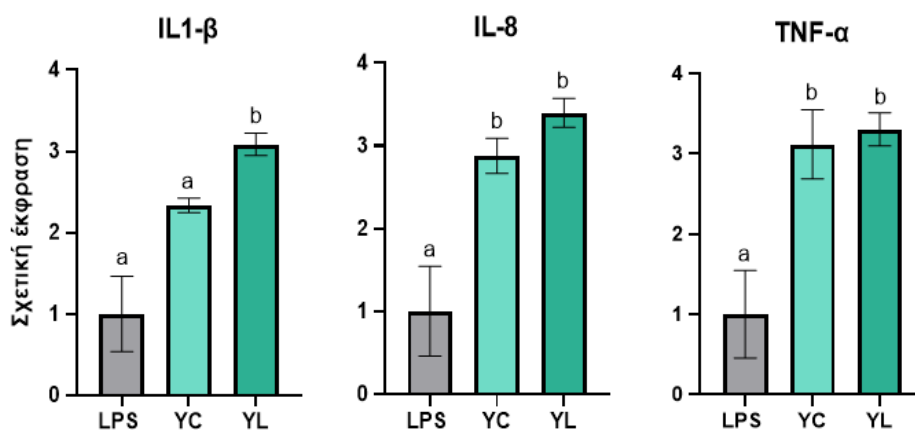
Διάγραμμα 4.12: Σχετική έκφραση των γονιδίων NF-κB-Rela, TNF-α, TGF-β, TLR4 και TLR2 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/ πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB) καθώς και πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE).

Τέλος, το δείγμα PSB προκάλεσε μείωση στην έκφραση του υποδοχέα TLR4 και TLR2 με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα LPS. Την ίδια επίδραση στην έκφραση του TLR2 είχε και το δείγμα PSE σε σχέση με το LPS.

Γενικότερα, με εξαίρεση το γονίδιο TGF-β, τα υπόλοιπα γονίδια (IL-1β, IL-10, IL-8, IL-6 NF-κB-Rela, TNF-α, TLR4 και TLR2) φαίνεται πως δεν εκδήλωσαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους ύστερα από την έκθεση των κυττάρων στα δείγματα YSB και YSE σε σχέση με το YC (**Διάγραμμα 4.11** και **Διάγραμμα 4.12**).

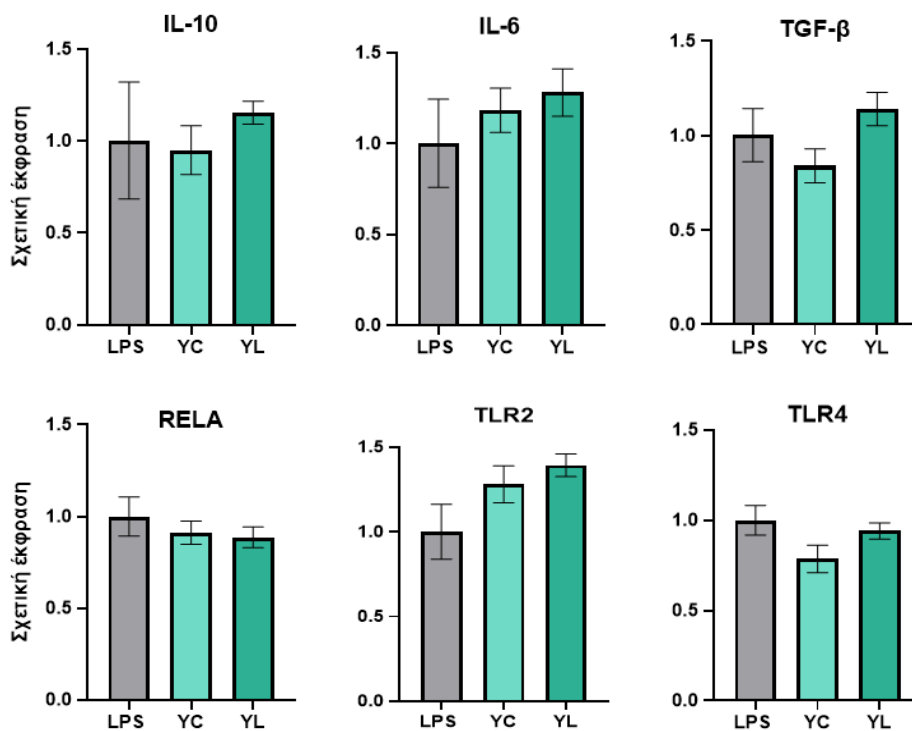
Όσον αφορά το δείγμα επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL), τα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων ύστερα από την έκθεση των κυττάρων σε αυτό, παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (**Διάγραμμα 4.13** και **Διάγραμμα 4.14**). Συγκεκριμένα, στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η σχετική έκφραση κάθε γονιδίου σε συνάρτηση με τα LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 που δεν εκτέθηκαν σε κάποιο δείγμα (LPS), καθώς και σε συνάρτηση με τα αντίστοιχα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στα πεπτιδικά κλάσματα των προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC) και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *S. platensis* (Y.L.).

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 4.13**, η σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων που εκτέθηκαν στο δείγμα YL σε σχέση με το δείγμα YC, έδειξε πως το πρώτο παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της ιντερλευκίνης IL-1β, χωρίς να παρατηρείται στατικώς σημαντική διαφορά ως προς την έκφραση κάποιου άλλου υπό μελέτη γονιδίου. Ωστόσο, συγκρίνοντας τη γονιδιακή έκφραση της έκθεσης των κυττάρων στα δείγματα YC και YL σε σχέση με το LPS (**Διάγραμμα 4.13**), φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση των γονιδίων IL-8 και TNF-α από την έκθεση και στα δύο δείγματα (YC και YL) χωρίς όμως να υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση της IL-1β από την έκθεση των κυττάρων στο δείγμα YL σε σχέση με το LPS, χωρίς να εκδηλώνεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του δείγματος YC και LPS.



Διάγραμμα 4.13: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1β, IL-8 και TNF-α από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC) και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL).

Η σχετική έκφραση των υπόλοιπων υπό μελέτη γονιδίων (IL-10, IL-6, TGF-β, NF-κB-Rela, TLR2 και TLR4) δεν εκδήλωσε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LPS, YC και YL (Διάγραμμα 4.14).



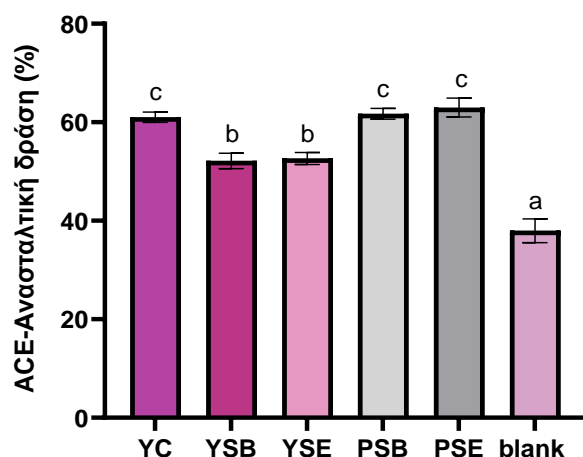
Διάγραμμα 4.14: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-10, IL-6, TGF-β, NF-κB-Rela, TLR2 και TLR4 από LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 (LPS) ύστερα από την έκθεσή τους σε πεπτιδικά κλάσματα (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC) και επιδορπίου

γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL).

4.4. Αποτελέσματα μεθόδου μέτρησης ACE-αναστολής (%)

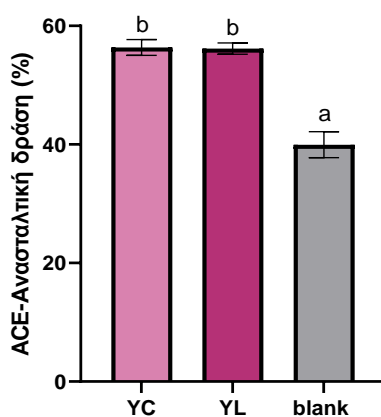
Με τη μέθοδο μέτρησης της ACE-αναστολής (%) προσδιορίστηκαν οι αντιυπερτασικές ιδιότητες των πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) που απομονώθηκαν ύστερα από προσομοίωση *in vitro* πέψης των δειγμάτων σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB), πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE) καθώς και επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *Spirulina platensis* (YL). Τα διαγράμματα παρουσιάζονται παρακάτω ως γραφική παράσταση του ποσοστού της ACE-αναστολής (άξονας Y) σε συνάρτηση με τις διαφορετικές περιπτώσεις (άξονας X) δειγμάτων (YC, YSB, YSE, PSB, PSE, YL) καθώς και με τον αρνητικό μάρτυρα της πέψης (blank). Οι διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων διακρίνονται με διαφορετικό χρώμα όπως φαίνεται παρακάτω, ενώ με διαφορετικά λατινικά γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ τους.

Όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα (**Διάγραμμα 4.15**), όλα τα δείγματα (YC, YSB, YSE, PSB, PSE) παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ACE-αναστολής (> 50%) με στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα της πέψης (blank) (37,9%). Συγκρίνοντας τα ποσοστά των δειγμάτων YSB και YSE με του δείγματος YC, φαίνεται πως το δείγμα YC εκδήλωσε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο ποσοστό ACE-αναστολής (61%) σε σχέση και με τα δύο δείγματα, των οποίων τα ποσοστά δεν είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (YSB: 52,1%, YSE: 52,6%). Ομοίως, τα ποσοστά των δειγμάτων PSB (61,7%) και PSE (62,9%), ενώ δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ούτε μεταξύ τους αλλά ούτε και με το δείγμα YC, εκδήλωσαν στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με τα ποσοστά ACE-αναστολής των YSB και YSE.



Διάγραμμα 4.15: Ποσοστό ACE-ανασταλτικής δράσης πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα σπιρουλίνας (YSB)/πρωτεϊνικό εκχύλισμά της (YSE), βιομάζας σπιρουλίνας (PSB), πρωτεϊνικού εκχυλίσματός της (PSE) και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (blank).

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 4.16**, τα δείγματα YC και YL δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο ποσοστό ACE-αναστολής μεταξύ τους (56,4% και 56,3% αντίστοιχα), ωστόσο εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα της πέψης (blank) (39,9%) κατά 16,5%.



Διάγραμμα 4.16: Ποσοστό ACE-ανασταλτικής δράσης πεπτιδικών κλασμάτων (0-3 kDa) προϊόντων πέψης σκέτου γιαουρτιού (YC), επιδορπίου γιαουρτιού με μερική αντικατάσταση του ζωικού λίπους με λιπαρά συστατικά της *S. platensis* (YL) και του αρνητικού μάρτυρα της πέψης (blank).

Κεφάλαιο 5^ο

Συζήτηση

5.1. Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες μικροφυκών

Η επίδραση της διατροφής στην υγεία αποτελεί σήμερα μια ευρέως διαδεδομένη γνώση. Στη γνώση αυτή βασίστηκε και η ραγδαία ανάπτυξη στην αγορά των λειτουργικών τροφίμων, μίας κατηγορίας τροφίμων, αποτελούμενη από φυσικά συστατικά, που πέρα από τη θρεπτική τους αξία παρέχουν και επιπλέον ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Ταυτόχρονα, η αύξηση, σε παγκόσμιο επίπεδο, ασθενειών που σχετίζονται με τη διατροφή όπως παχυσαρκία, διαβήτης, καρκίνος, αναιμία, υπέρταση και άλλα καρδιαγγειακά νοσήματα, έχει προκαλέσει τη στροφή των καταναλωτών σε πιο υγιεινές επιλογές τροφίμων και στην αναζήτηση προϊόντων με βιολειτουργικές ιδιότητες.

Βάση για την ανάπτυξη τέτοιων προϊόντων μπορούν να αποτελέσουν τα μικροφύκη, βρώσιμοι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί με υψηλή θρεπτική αξία, καθώς αποτελούν πηγές πρωτεϊνών, υδατανθράκων, βιταμινών, χρωστικών, ακόρεστων λιπαρών οξέων και πολλών βιοενεργών συστατικών (Lafarga *et al.*, 2020). Η *Arthrospira (Spirulina) platensis* και η *Chlorella vulgaris* συνιστούν τα πιο ευρέως καταναλώμενα μικροφύκη (Barkallah *et al.*, 2017). Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη ανά % ξηράς ουσίας, του καλά ισορροπημένου προφίλ αμινοξέων καθώς και των βιοενεργών πεπτιδίων που εμπεριέχουν στην αλληλουχία των πρωτεϊνών τους (Hyrslava *et al.*, 2021). Αρκετές πρόσφατες *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν αναφερθεί στην πολλαπλή θετική επίδραση των βιοενεργών πεπτιδίων, των δύο αυτών μικροφυκών, στην υγεία (Morris *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Sedighi *et al.*, 2018; Ovando *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2021). Η απελευθέρωση των πεπτιδίων αυτών από τις πρωτεΐνες τους προϋποθέτει τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως π.χ. πεψίνη, θρυψίνη, παπαΐνη, και παγκρεατίνη που συνιστούν κύρια ένζυμα της πέψης και ανευρίσκονται στο στομάχι και στο λεπτό έντερο (Giromini *et al.*, 2017).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι *in vitro* ανοσορυθμιστικές ιδιότητες της *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris* εμπλουτισμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου, καθώς και οι ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες καινοτόμων προϊόντων επιδόρπιου γιαουρτιού εμπλουτισμένα με συστατικά/βιομάζα της *Spirulina platensis*. Η μελέτη διεκπεραιώθηκε ύστερα από προσομοίωση πέψης των δειγμάτων και απομόνωση των πεπτιδικών κλασμάτων τους μεγέθους 0-3 kDa. Σκοπός της *in vitro* πέψης είναι μέσω της χρήσης ενζύμων όπως η πεψίνη και η παγκρεατίνη, να επιτευχθεί απελευθέρωση βιοενεργών

πεπτιδίων από τις πρωτεΐνες των δειγμάτων όπως υποστηρίζουν οι Korhonen & Pihlanto (2006). Η δράση των πεπτιδίων αυτών εξαρτάται από την βιοδιαθεσιμότητά τους, την αλληλουχία των αμινοξέων τους καθώς και από το μέγεθός τους. Σύμφωνα με αποτελέσματα των Liu & Fu (2022), πάνω από το 90% των προϊόντων υδρόλυσης της φυκομπιλοπρωτεΐνης της *S. platensis* από τα ένζυμα θρυψίνη, πεψίνη και παπαΐνη ήταν πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (< 3 kDa). Επιπλέον, οι Giromini *et al.* (2019) αναφέρουν πως πεπτίδια μικρού μεγέθους προερχόμενα από την πέψη πρωτεϊνών γάλακτος (< 3 kDa), μπορούν να απορροφηθούν *in vivo* από τα επιθηλιακά κύτταρα κατά μήκος του λεπτού εντέρου και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, σε αντίθεση με τα πολυπεπτίδια (> 3 kDa) τα οποία ασκούν τη δράση τους τοπικά σε γαστρεντερικό επίπεδο και διέρχονται στο περιβάλλον του παχέος εντέρου. Τέλος, σύμφωνα με τους Lee & Hur (2017) και Zhang *et al.* (2022) τα πεπτίδια με μοριακό βάρος < 3 kDa διαθέτουν υψηλή ανασταλτική δράση κατά του ενζύμου ACE. Για τους λόγους αυτούς και για την προσομοίωση της εντερικής απορρόφησης επιλέχθηκαν να μελετηθούν πεπτιδικά κλάσματα μεγέθους < 3 kDa.

Οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των δειγμάτων προσδιορίστηκαν με βάση τη σχετική έκφραση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης από LPS-διεγερμένα μακροφάγα κύτταρα THP-1, ύστερα από την έκθεσή τους στα δείγματα για 24 ώρες. Τα κύτταρα αυτά, χρησιμοποιούνται ευρέως ως *in vitro* μοντέλα για τη μελέτη της ανοσιακής απόκρισης (Chanput, 2014; Millán-Linares *et al.*, 2014). Οι Chanput *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν τα LPS- διεγερμένα μακροφάγα THP-1 για τη μελέτη της ανοσιακής απόκρισης ύστερα από την έκθεσή τους σε πρωτεΐνες τροφίμων.

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος Gram-αρνητικών βακτηρίων διεγείρει τα ανθρώπινα κύτταρα, σε μια διαδικασία εξαρτώμενη από υποδοχείς, ενεργοποιώντας την απελευθέρωση αρκετών ανοσοποιητικών μεσολαβητών. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS μπορούν να παράγουν κυτοκίνες που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση όπως IL-8, IL-1β, IL-6 και TNF-α (Arena *et al.*, 2015). Για το λόγο αυτό, τα διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα εκτέθηκαν μόνο σε LPS και σε LPS-δείγμα προκειμένου να συγκριθεί το μεταγραφικό επίπεδο των υπό μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος .

Στις ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των μικροφυκών και των πεπτιδίων που προέρχονται από τις πρωτεΐνες τους, έχουν αναφερθεί οι μελέτες των Hirahashi *et al.* (2002), Morris *et al.* (2010), Ravi *et al.* (2010), Shorki *et al.* (2012), Vo *et al.* (2013), Wu *et al.* (2016), Chalamaiah *et al.* (2018), Kang *et al.* (2019) και Hyrslova *et al.* (2021). Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων των κυττάρων που εκτέθηκαν στα μικροφύκη έδειξαν πως από τα δείγματα της *S. platensis*, το δείγμα S.183 παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της

ισχυρά αντι-φλεγμονώδης IL-10, της IL-6 και του παράγοντα TNF- α συγκριτικά με το δείγμα S.C. (μάρτυρα).

Ο παράγοντας TNF- α λειτουργεί ως εκκινήτης της φλεγμονώδους απόκρισης καθώς συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανοσοποιητικών κυττάρων και δίνει σε αυτά το έναυσμα για την έκκριση προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η IL-10 (Yang *et al.*, 2018; Hyrslova *et al.*, 2021). Η ισχυρά αντι-φλεγμονώδη δράση της IL-10 έχει ως συνέπεια τη συμμετοχή της στην πρόληψη φλεγμονωδών και αυτοάνοσων καταστάσεων (Iyer & Cheng, 2012). Αναστολή της φλεγμονής μπορεί να προκαλέσει και η δράση της πλειοτροπικής IL-6, η οποία όπως και η IL-10, παράγεται σε απόκριση των αυξημένων επιπέδων του TNF- α (Srirangan & Choy, 2010; Hyrslova *et al.*, 2021).

Επιπλέον, το δείγμα S.183 σε σχέση με το S.C. εκδήλωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B και της χημειοκίνης MCP-1. Ο NF- κ B ύστερα από σηματοδότηση από ειδικούς υποδοχείς, ενεργοποιεί ένα πρόγραμμα έκφρασης ανοσορυθμιστικών γονιδίων όπως IL-1 β , IL-6 και TNF- α , ενώ η MCP-1 εκφράζεται ύστερα από ενεργοποίησή της από μεσολαβητές όπως TNF- α , και σηματοδοτεί το μονοπάτι του NF- κ B (Yadav & Arora, 2010).

Σε αντιστοιχία με τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται και οι ενδείξεις της μελέτης των Chen *et al.* (2014) οι οποίοι εξέτασαν την ανοσολογική απόκριση της κυτταρικής σειράς μακροφάγων ποντικού J774A στη φυκοκυανίνη. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως η φυκοκυανίνη επάγει την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων μέσω αύξησης της έκφρασης των κυτοκινών TNF- α και IL-6. Η φυκοκυανίνη, βασική φυκομπιλο-πρωτεΐνη της σπιρουλίνας, αντιπροσωπεύει το 60% της ολικής πρωτεΐνης στο μικροφύκος και αποτελείται από δύο υπομονάδες πρωτεϊνών (α και β) (Romay *et al.*, 2003; Martínez-Palma *et al.*, 2015). Συνεπώς είναι πιθανό στην αλληλουχία της να εμπεριέχονται πεπτιδία που ασκούν ανοσορυθμιστική δράση. Οι Martínez-Palma *et al.* (2015) προσομοίωσαν τη γαστρεντερική πέψη της *Spirulina maxima* και εκχυλίσματος φυκομπιλο-πρωτεϊνών της, με χρήση των ενζύμων πεψίνη και παγκρεατίνη, και παρατήρησαν με ηλεκτροφόρηση την παρουσία πεπτιδίων, ενώ ταυτόχρονα τεκμηρίωσαν τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Ομοίως, αύξηση στην έκφραση του TNF- α από LPS - διεγερμένα μακροφάγα RAW προκάλεσε η έκθεσή τους σε κλάσμα πολυσακχαρίτη της *S. platensis* σύμφωνα με τους Parages *et al.* (2012). Επιπλέον, η qPCR ανάλυση της έρευνας των Grzanna *et al.* (2006) που εφαρμόστηκε σε THP-1 κύτταρα παρουσίασε αύξηση στην έκφραση του TNF- α και της MCP-1 ύστερα από έκθεση σε κλάσμα πολυσακχαρίτη της *S. platensis*. Η έρευνα των Ravi *et al.* (2010) επίσης τεκμηριώνει την ανοσο-ενισχυτική ικανότητα της *S. platensis* μέσω ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης των THP-1 κυττάρων και αυξημένης έκφρασης των γονιδίων του

TNF- α και της MCP-1. Ωστόσο, οι Ravi *et al.* (2010) αναφέρονται στην επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης από τη σπιρουλίνα μέσω σηματοδότησης από τους υποδοχείς TLR2 και TLR4. Κάτι τέτοιο φαίνεται να μην ισχύει στην παρούσα μελέτη καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα η έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της σπιρουλίνας και πιθανώς η έκφραση των κυτοκινών να σηματοδοτείται από άλλους υποδοχείς. Οι Shokri *et al.* (2014) έλεγξαν την *in vivo* ανοσορυθμιστική επίδραση υδάτινου εκχυλίσματος της *S. platensis* σε καρκινικά ποντίκια μέσω της έκφρασης μιας σειράς ιντερλευκινών και του παράγοντα TNF- α . Τα ευρήματά τους έδειξαν αύξηση στην έκφραση του TNF- α που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ωστόσο, έδειξαν μείωση στην έκφραση της IL-10 σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου εντοπίστηκε αύξηση.

Οι Hysrlova *et al.* (2021) αξιολόγησαν την ανοσορυθμιστική επίδραση υδάτινου διαλύματος *Chlorella vulgaris* (0,5%, 1% και 3%) σε ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερειακού συστήματος (hPBMCs). Τα ευρήματά τους παρουσίασαν αυξημένη έκκριση των κυτοκινών TNF- α , IL-6 και IL-10 συγκριτικά με το μάρτυρα, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στη χαμηλότερη συγκέντρωση της *Chlorella*. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα της *Chlorella vulgaris* στην παρούσα μελέτη, καθώς τόσο το δείγμα C. 183 όσο και το C. 61 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση της IL-10, ενώ δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των TNF- α και IL-6 σε σχέση με το μάρτυρα. Ωστόσο, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του δείγματος σπιρουλίνας S. 183 όσον αφορά την έκκριση των κυτοκινών. Μείωση στην έκφραση της IL-10 παρατήρησαν στην έρευνά τους και οι Hasegawa *et al.* (2000) ύστερα από χορήγηση εκχυλίσματος της *Chlorella vulgaris* σε ποντίκια με σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας. Γενικότερα, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται πως τα δείγματα της *Chlorella vulgaris* δεν παρουσίασαν ξεκάθαρη εικόνα της φλεγμονώδους απόκρισης των κυττάρων, διότι με εξαίρεση την έκφραση της IL-10 και του υποδοχέα TLR2, η έκφραση των υπόλοιπων κυτοκινών δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τα δείγματα C. 183 και C. 61 σε σχέση με το μάρτυρα (C.C.). Επιπλέον, σε αντίθεση με την περίπτωση της σπιρουλίνας, δεν παρατηρήθηκε σταθερότητα στα αποτελέσματα έκφρασης των κυτοκινών μεταξύ των δειγμάτων C. 183 και C. 61.

Οι Sibi & Rabina (2016) προσδιόρισαν την *in vitro* αντι-φλεγμονώδη δράση διαφορετικών εκχυλισμάτων χλωρέλλας (κ-εξάνιο, αιθανόλη, χλωροφόρμιο και νερό) μέσω έκφρασης κυτοκινών από LPS-διεγερμένα κύτταρα RAW 264.7. Βρέθηκε πως η αντι-φλεγμονώδης επίδραση του υδάτινου εκχυλίσματος και του εκχυλίσματος αιθανόλης δεν ήταν σημαντική στη συγκεκριμένη μελέτη.

Η διαφορά αυτή στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μικροφυκών πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετικότητα του είδους. Η σπιρουλίνα αποτελείται από πολυάριθμα προκαρυωτικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια (κυανοβακτήρια) με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με αυτά. Για παράδειγμα, διαθέτει λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (Elsonbaty & Ismail, 2020), ένα συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης Gram αρνητικών βακτηρίων, που ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση των ανοσο-κυττάρων και ενεργοποιεί την έκφραση προ- και αντί-φλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά (Chanput *et al.*, 2010; Bosshart & Heinzelmann, 2016). Αντιθέτως, η χλωρέλλα αποτελεί ευκαρυωτικό μικροφύκος με δομή όμοια με αυτή των φυτικών κυττάρων.

Άλλη μία βασική διαφορά μεταξύ των δύο μικροφυκών είναι πως η χλωρέλλα σε αντίθεση με τη σπιρουλίνα διαθέτει ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα το οποίο περιέχει τον πολυσακχαρίτη κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό μειώνει την πεπτικότητα των πρωτεϊνών της καθώς δυσκολεύει την προσβασιμότητα των πεπτικών ενζύμων σε αυτές όταν το κύτταρο είναι άθικτο (Sedighi *et al.*, 2019; Widyaningrum & Prianto, 2021). Έτσι, ενδέχεται η απελευθέρωση βιοενεργών συστατικών όπως πεπτίδια με πιθανές ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, να είναι πιο αποδοτική από την πέψη της σπιρουλίνας παρά της χλωρέλλας.

Όσον αφορά τα δείγματα της σπιρουλίνας, το δείγμα S.183 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση πολλών κυτοκινών (ICAM, TNF- α , MCP-1, NF- κ B και TGF- β) και συγκριτικά με το δείγμα S. 61. Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει πως η αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου, που αποτελεί την κύρια διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων, να ενεργοποίησε την ανοσολογική απόκριση των υπό μελέτη κυττάρων. Οι Marcil *et al.* (2011), που ανέλυσαν την επίδραση του σιδήρου και της βιταμίνης C στην φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων THP-1, βρήκαν πως η επώαση των κυττάρων παρουσία σιδήρου/ασκορβικού οξέος (100/1000 μ M) προκάλεσε επαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης των κυττάρων.

Τέλος, να αναφερθεί πως τα δείγματα S.183 και C.183 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση των κυρίως προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-8, IL-6 και TNF- α σε σχέση με το Blank. Οι Ha *et al.*, (1999) εξηγούν πως οι προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες όπως η IL-6, η IL-8 και ο TNF- α ενεργοποιούν έναν αριθμό σημαντικών κυτταρικών διεργασιών που μπορεί να είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη αυτοάνοσων νόσων. Συγκεκριμένα αναφέρουν πως ο TNF- α ανιχνεύεται σε ιστούς-στόχους ασθενών με αυτοάνοση νόσο του θυροειδούς, ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθματώδη λύκο και σκλήρυνση κατά πλάκας. Συνεπώς, συγκριτικά με τον μάρτυρα (Blank) τα δείγματα αυτά πιθανόν να εκδηλώνουν προ-φλεγμονώδη δράση.

Συμπερασματικά, η *Spirulina platensis* με 183 mg Fe/L φαίνεται πως επάγει την ανοσολογική απόκριση των LPS- διεγερμένων THP-1 μέσω έκφρασης της ισχυρά αντί-φλεγμονώδους

κυτοκίνης IL-10, των γονιδίων TNF- α , IL-6, MCP-1 και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Η *Chlorella vulgaris* δεν παρουσίασε ξεκάθαρη εικόνα της φλεγμονώδους απόκρισης των κυττάρων. Ωστόσο, η μείωση στην έκφραση της IL-10 με την αύξηση της συγκέντρωσης του Fe οδηγεί προς κατεύθυνση κυρίως προ-φλεγμονώδους απόκρισης.

5.2. Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα/συστατικά της *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός από τα δείγματα μικροφυκών μελετήθηκαν ως προς τις ανοσορυθμιστικές τους ιδιότητες και δείγματα καινοτόμων προϊόντων επιδορπίου γιαουρτιού εμπλουτισμένα με συστατικά (πρωτεϊνικό εκχύλισμα/εκχύλισμα λιπιδίων/βιομάζα) της *Spirulina platensis*. Ο εμπλουτισμός γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης με μικροφύκη έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές στον τομέα των τροφίμων τα τελευταία χρόνια. Τα θρεπτικά και βιοδραστικά συστατικά των μικροφυκών σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα του γιαουρτιού, φαίνεται να συμβάλουν στην ανάπτυξη ενός καινοτόμου προϊόντος με αυξημένη θρεπτική αξία και επιπλέον οφέλη για την υγεία σε σχέση με την κατανάλωσή τους ως ξεχωριστά τρόφιμα (Beheshtipour *et al.*, 2013; Suzery & Widiastuti, 2018; Pan-utai *et al.*, 2020; El-Sattar *et al.*, 2021; Hyrslova *et al.*, 2021; Hernández *et al.*, 2022). Επίσης, έχει βρεθεί πως τα θρεπτικά συστατικά, οι βιταμίνες και τα μέταλλα των μικροφυκών έχουν θετική επίδραση στη βιωσιμότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που εμπεριέχονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης, κάτι το οποίο αποτελεί βασικό κριτήριο ποιότητας, δεδομένου ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για ένα μεγάλο μέρος των ευεργετικών ιδιοτήτων αυτών των προϊόντων στην υγεία (Beheshtipour *et al.*, 2012; Beheshtipour *et al.*, 2013; Barkallah *et al.*, 2017; Hyrslova *et al.*, 2021). Έτσι, όπως υποστηρίζουν και οι Hyrslova *et al.* (2021) τα μικροφύκη λειτουργούν ως πρεβιοτικά για τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες. Αντίστοιχα η κατανάλωση τόσο των οξυγαλακτικών μικροοργανισμών, μέσω του γιαουρτιού, όσο και των μικροφυκών, μπορεί να ενισχύσει τη φυσική μικροχλωρίδα του εντέρου και κατ' επέκταση το ανοσοποιητικό σύστημα δεδομένου ότι το έντερο συνιστά βασικό όργανο του συστήματος αυτού αποτελώντας φραγμό για την εισβολή παθογόνων βακτηρίων (Spahn, & Kucharzik, 2004).

Επιπλέον, το γιαούρτι όπως και τα μικροφύκη αποτελούν πηγή πρωτεϊνών. Η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πεπτιδίων με πολλές βιολογικές ιδιότητες, ανάμεσα στις οποίες και οι ανοσορυθμιστικές. Στο γιαούρτι, τόσο κατά την παρασκευή όσο και κατά τη διατήρησή του, η πρωτεόλυση από ένζυμα των οξυγαλακτικών

βακτηρίων που διαθέτει, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τέτοιων πεπτιδίων. Αντίστοιχο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και η πρωτεόλυση από ένζυμα κατά την πέψη του τροφίμου (Korhonen & Pihlanto, 2006; Korhonen & Pihlanto, 2007; Haque & Kapila, 2009; Da Silva & Rudkowska, 2015; Politis & Theodorou, 2016; Theodorou & Politis, 2016; Abd El-Fattah *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2022).

Στην παρούσα εργασία οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των πεπτιδικών κλασμάτων των επιδορπίων γιαουρτιού, όπως και στα δείγματα μικροφυκών, μελετήθηκαν από την σχετική έκφραση γονιδίων από LPS- διεγερμένα μακροφάγα THP-1 που εκτέθηκαν στα δείγματα μετά την *in vitro* πέψη τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έκθεση των κυττάρων στα δείγματα YSB και YSE, συγκριτικά με το δείγμα-μάρτυρα (YC), παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του γονιδίου TGF-β, με το δείγμα YSE να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση. Σύμφωνα με τους Da Silva & Rudkowska, (2015) πολλά συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων συμβάλουν στη ρύθμιση των παραμέτρων φλεγμονής. Ωστόσο τα συστατικά αυτά, τόσο κατά την επεξεργασία του γάλακτος για την παραγωγή γιαουρτιού όσο και κατά την πέψη του προϊόντος, δεν φτάνουν άθικτα στα κύτταρα λόγω της δράσης διαφόρων ενζύμων. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη και η επίδραση των δομικών τους μονάδων, π.χ. πεπτιδίων, στην ανοσολογική απόκριση των κυττάρων αλλά και στην αλληλεπίδρασή τους με άλλα συστατικά του τροφίμου π.χ. *Spirulina platensis*. Σύμφωνα με τον Κουτελιδάκη, (2015) τα πεπτίδια που προστίθενται σε κάποιο τρόφιμο, ενδέχεται να αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του τροφίμου και αυτό να επηρεάσει την βιοδραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητά του.

Επιπλέον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια που εμπεριέχονται στο γιαούρτι φαίνεται να εκδηλώνουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες και να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση των ανοσοποιητικών κυττάρων (Dargahi & Apostolopoulos, 2021; Allouche *et al.* 2022). Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν μια πρωτεΐνάση δεσμευμένη στο κυτταρικό τους τοίχωμα και αρκετές ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν τον πρωτεολυτικό μηχανισμό των βακτηρίων και συμβάλουν στην απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων από τις πρωτεΐνες του γιαουρτιού τόσο κατά την παραγωγή και διατήρησή του, όσο και κατά την πέψη του από ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες λυμένων βακτηρίων μετά την κατανάλωσή του (Theodorou & Politis, 2016; Dargahi & Apostolopoulos, 2021; Allouche *et al.* 2022). Σύμφωνα με την μελέτη των Allouche *et al.* (2022) τα βιοενεργά πεπτίδια που απελευθερώθηκαν κατ' αυτόν τον τρόπο από το βακτήριο *Streptococcus termophilus* LMD-9 εκδήλωσαν προ-φλεγμονώδη δράση και προκάλεσαν την έκκριση του TNF-α από LPS-διεγερμένα THP-1 μακροφάγα ομοίως με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το δείγμα YSB σε σχέση με το LPS. Αντιθέτως, οι Arena *et al.* (2015) που μελέτησαν την ανοσορυθμιστική δράση γιαουρτιών με προβιοτικά μετά

την *in vitro* πέψη τους σε LPS-διεγερμένα μακροφάγα THP-1, εντόπισαν μείωση του TNF- α . Αντίστοιχα, οι Maccaferri *et al.* (2012) και Candela *et al.* (2008) επισημαίνουν πως αρκετοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί προκαλούν μείωση στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-8, IL-6, TNF- α , τονίζοντας την αντιφλεγμονώδη δράση τους.

Στο άρθρο τους, οι Meydani & Ha, (2000) αναφέρουν πως η κατανάλωση γιαουρτιού, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένους πληθυσμούς όπως οι ηλικιωμένοι, μπορεί να ενισχύσει την ανοσολογική απόκριση και αυτό με την σειρά του να αυξήσει την ανοχή σε ασθένειες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό. Επίσης, οι Ha *et al.*, (1999) παρατήρησαν πως η παρατεταμένη σίτιση ποντικών με γιαούρτι, προκάλεσε μείωση σε πολλές κυτοκίνες ανάμεσα στις οποίες σημαντική μείωση παρουσίασε ο παράγοντας TGF- β , όπως και στη παρούσα μελέτη.

Γενικότερα, ο παράγοντας TGF- β είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη με ποικίλες δράσεις που συμβάλει στη ρύθμιση της φλεγμονής, της ομοιόστασης, και των ανοσολογικών αποκρίσεων. Ο ρόλος του TGF- β φαίνεται να είναι προστατευτικός στην ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων καθώς αναστέλλει τις αποκρίσεις των ανοσοκυττάρων, ανάμεσα στα οποία και τα μακροφάγα, και των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, ενώ ενεργοποιείται από την παρουσία αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών (Akihiko *et al.* 2010; Theodorou & Politis, 2016). Έτσι, φαίνεται να παρουσιάζει κυρίως αντι-φλεγμονώδη δράση (Braesch-Andersen *et al.*, 2013). Ωστόσο, οι Csernok *et al.* (1996) αναφέρουν πως σε ορισμένα κύτταρα, όπως ουδετερόφιλα, ο παράγοντας TGF- β μπορεί να εκδηλώνει προ-φλεγμονώδη δράση. Πρόσφατα, οι Yu *et al.* (2017) βρήκαν πως ο TGF- β προωθεί την ανάπτυξη και ομοιόσταση σε μακροφάγα κυψελίδας εκδηλώνοντας έτσι προ-φλεγμονώδη δράση. Συνεπώς, η μείωση της έκφρασής του πιθανόν να υποδηλώνει μείωση της απόκρισης των ανοσοποιητικών κυττάρων στη φλεγμονή ή αντι-φλεγμονώδη δράση. Στη μελέτη των Theodorou & Politis, (2016) η έκθεση των ουδετερόφιλων σε πεπτίδια γιαουρτιού από πρόβειο γάλα προκάλεσε επίσης μείωση στην έκφραση του παράγοντα TGF- β με συμπέρασμα το γιαούρτι να εκδηλώνει κυρίως αντι-φλεγμονώδη δράση.

Η έκφραση των υπόλοιπων υπό μελέτη γονιδίων (IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α , NF- κ B-Rela, TLR4 και TLR2) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τα δείγματα αυτά.

Συμπερασματικά, το γιαούρτι εμπλουτισμένο με βιομάζα της *Spirulina platensis* και το γιαούρτι με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του μικροφύκου, διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση των LPS-διεγερμένων μακροφάγων THP-1 μέσω της μειωμένης έκφρασης του TGF- β , πιθανώς εκδηλώνοντας αντι-φλεγμονώδη δράση.

Η έκθεση των LPS-διεγερμένων THP-1 μακροφάγων στο κλάσμα του δείγματος YL, σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην έκφραση της IL-1 β σε

σχέση με δείγμα-μάρτυρα (YC). Η IL-1β αποτελεί κυρίως προφλεγμονώδη κυτοκίνη που παράγεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα και στις δράσεις της εντάσσεται η διέγερση μονοκυττάρων και μακροφάγων προς παραγωγή κυτοκινών όπως TNF-α και IL-6, διέγερση πολλαπλασιασμού B-λεμφοκυττάρων και διέγερση T-λεμφοκυττάρων προς παραγωγή κυτοκινών (Diniz *et al.*, 2023). Ως εκ τούτου, φαίνεται πως το δείγμα YL επάγει την ανοσολογική απόκριση των THP-1 μακροφάγων προκαλώντας κυρίως προ-φλεγμονώδη δράση συγκριτικά με το YC. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Håversen *et al.* (2009), L'homme *et al.* (2013) και Da Silva & Rudkowska (2015). Συγκεκριμένα, οι Håversen *et al.* (2009) βρήκαν πως συστατικά γαλακτοκομικών προϊόντων και κυρίως λιπαρά οξέα, προκάλεσαν προ-φλεγμονώδη δράση μέσω αυξημένης έκφρασης των IL-1β, IL-8 και TNF-α από THP-1 κύτταρα. Ομοίως, η δωρη έκθεση των THP-1 σε λιπαρά οξέα γαλακτοκομικών προϊόντων προκάλεσε αύξηση στην έκφραση της IL-1β. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση των Da Silva & Rudkowska (2015) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα γαλακτοκομικών προϊόντων προκαλούν κυρίως αντι-φλεγμονώδη δράση ενώ τα λιπαρά οξέα προ-φλεγμονώδη. Σε συμφωνία με το συμπέρασμα αυτό βρίσκονται και τα αποτελέσματα των Liang *et al.* (2022) όπου πεπτίδια από *in vitro* πέψη γάλακτος προκάλεσαν μείωση στην έκφραση του TNF-α και IL-8 από LPS-διεγερμένα THP-1 μακροφάγα σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Αντίστοιχα, πεπτίδια καζεϊνών γάλακτος προκάλεσαν μείωση στην έκφραση της IL-1β από ποντίκια (Nakamura *et al.*, 2013). Έτσι, πιθανόν η προ-φλεγμονώδη δράση που προκάλεσε το δείγμα YL να οφείλεται στα λιπαρά οξέα του γιαουρτιού. Μάλιστα, η δράση των λιπαρών οξέων γιαουρτιού πιθανόν να υπερισχύει της αντίστοιχης λιπαρών οξέων της *S. platensis* καθώς σύμφωνα με τους Shiels *et al.* (2022) το εκχύλισμα λίπους της σπιρουλίνας πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα εκδηλώνει αντι-φλεγμονώδη δράση *in vitro* σε ανθρώπινα αιμοπετάλια ενώ η κατανάλωση *S. platensis* από ποντίκια προκάλεσε μείωση στην έκφραση της προ-φλεγμονώδους IL-1β (Diniz *et al.*, 2023). Τα τελευταία έρχονται σε αντίθεση με όσα αναφέρθηκαν για την παρούσα μελέτη παρόλο που η σύγκριση με *in vivo* μελέτες δεν μπορεί να είναι απόλυτη. Επίσης, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα για την τεκμηρίωση της δράσης των λιπαρών οξέων τόσο του γιαουρτιού και των μικροφυκών όσο και του συνδυασμού τους στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Γενικότερα, οι μελέτες για την ανάπτυξη τέτοιων υβριδικών προϊόντων βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη. Οι περισσότερες από αυτές αφορούν την επίδραση των μικροφυκών στη βιωσιμότητα των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών του γιαουρτιού και στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, κυρίως λόγω της ιδιαιτερότητας του χρώματος και της γεύσης των μικροφυκών (Barkallah *et al.*, 2017; Abd El-Fattah *et al.*, 2018; Suzery & Widiastuti, 2018;

Lafarga *et al.*, 2020; Pan-utai *et al.*, 2020; El-Sattar *et al.*, 2021; Gumus & Gharibzahedi, 2021; Hernández *et al.*, 2022).

5.3. Αντιυπερτασικές ιδιότητες επιδορπίων γιαουρτιού εμπλουτισμένα με βιομάζα/συστατικά της *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Η υπέρταση αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για τη δημόσια υγεία καθώς ευθύνεται για το 45% περίπου των θανάτων που σχετίζονται με καρδιαγγειακή νόσο (Anekthanakul *et al.*, 2019). Το ένζυμο ACE διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και σε ορισμένες καταστάσεις συμβάλει στην προώθηση της υπέρτασης. Αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της υπέρτασης (π.χ. καπτοπρίλη, βεναζεπρίλη, εναλαπρίλη) διαθέτουν παρεμποδιστική δράση κατά του ενζύμου αυτού. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά έχουν συσχετιστεί με ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως ξηρός βήχας και αγγειοοίδημα κ.α., με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ζήτηση για φυσικούς παρεμποδιστές του ενζύμου (Anekthanakul *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Τέτοιοι φυσικοί ACE-παρεμποδιστές αποτελούν πεπτίδια προερχόμενα από διάφορες πηγές πρωτεϊνών όπως τα μικροφύκη και τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης.

Πεπτίδια με ACE-ανασταλτική δράση έχουν εντοπισθεί *in vitro* από πρωτεΐνες της *Spirulina platensis* (Suetsuna & Chen, 2001; Lu *et al.* 2010; Pan *et al.* 2015; Zheng *et al.*, 2017; He *et al.* 2018; Anekthanakul *et al.*, 2019) καθώς και διαφόρων ειδών γιαουρτιού (Yamamoto *et al.*, 1999; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000; Chobert *et al.*, 2005; Donkor *et al.*, 2007; Murray & Fitzgerald, 2007; Papadimitriou *et al.*, 2007; Ong & Shah, 2008; Ha, Chang, & Jo, 2015; Georgalaki *et al.*, 2017). Για την απελευθέρωση των πεπτιδίων αυτών από τις πρωτεΐνες τους είναι απαραίτητο να προηγηθεί δράση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως π.χ. πεψίνη, θρυψίνη, παπαΐνη, και παγκρεατίνη (Giromini *et al.*, 2017). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε πεπτίδια μεγέθους < 3 kDa χαρακτηρίζονται από υψηλή ανασταλτική δράση κατά του ενζύμου ACE και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (Lee & Hur, 2017; Giromini *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022).

Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη οι αντιυπερτασικές ιδιότητες των δειγμάτων επιδορπίων γιαουρτιού (YC, YSB, YSE, YL) βιομάζας (PSB) και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (PSE) της *S. platensis* προσδιορίστηκαν ύστερα από προσομοίωση *in vitro* πέψης με χρήση ενζύμων πεψίνη και παγκρεατίνη και απομόνωση των πεπτιδικών κλασμάτων μεγέθους < 3 kDa. Συγκεκριμένα, η αντιυπερτασική δράση των πεπτιδικών κλασμάτων προσδιορίστηκε μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση που ασκεί το ένζυμο ACE στο υπόστρωμα FAPGG. Σύμφωνα με τους Shalaby *et al.* (2006) η μέθοδος με χρήση του FAPGG ως υπόστρωμα είναι κατάλληλη για μελέτη αντιυπερτασικών ιδιοτήτων πεπτιδίων καθώς είναι απλή, γρήγορη, απαιτεί λιγότερο

εξοπλισμό/υλικά και επιτρέπει την ανάλυση αρκετών δειγμάτων ανά ημέρα συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά ACE-αναστολής παρουσία πεπτιδικών κλασμάτων και υποστρώματος σε σχέση με την απουσία τους.

Πιο αναλυτικά, τόσο τα δείγματα σκέτου και επιδόρπιων γιαουρτιού (YC, YSB, YSE, YL) όσο και τα δείγματα βιομάζας και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της *S. platensis* (PSB και PSE), παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ACE-αναστολής, με τιμές YC: 61%, YSB: 52,1%, YSE: 52,6%, YL: 56,3%, PSB: 61,7% και PSE: 62,9%, και με στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα της πέψης (blank) του οποίου η ACE-αναστολή ήταν κατά μέσο όρο 38,9%. Τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) των Georgalaki et al. (2017) που μελέτησαν την ACE-ανασταλτική δράση πεπτιδικών κλασμάτων ορού γάλακτος που ζυμώθηκε με καλλιέργειες γιαουρτιού, έδειξαν πως η ζύμωση πρόβειου γάλακτος με *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* προκάλεσε ACE-αναστολή 58-68% (ανάλογα το κλάσμα), ενώ η ζύμωση με *S. thermophilus* έδειξε αναστολή 55-71%, τιμές που πλησιάζουν τις αντίστοιχες της παρούσας μελέτης.

Τα ευρήματα των Hernández-Ledesma et al. (2005) έδειξαν πως η ACE-ανασταλτική δράση υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος ζυμωμένου γάλακτος εμπορίου ήταν 74,3%, ενώ του παστεριωμένου και UHT (Ultra-High Temperature) γάλακτος ήταν χαμηλότερη από 2%, υποδεικνύοντας έτσι και τη σημασία της ζύμωσης στην απελευθέρωση πεπτιδίων με ACE-ανασταλτική δράση από πρωτεΐνες γάλακτος. Ταυτόχρονα, η ACE-αναστολή των πεπτιδικών κλασμάτων του ζυμωμένου γάλακτος (35-160 mg/100g) που διαχωρίστηκαν με HPLC, έδειξε ποσοστό που κυμαίνεται από 12 έως 80% ανάλογα το κλάσμα.

Τα πεπτιδικά κλάσματα που λήφθηκαν από λυοφιλοποιημένο υδάτινο εκχύλισμα γιαουρτιού-μάρτυρα και γιαουρτιού υψηλής πρωτεϊνοπεριεκτικότητας (7,24%) έδειξαν ACE-αναστολή σε υπόστρωμα HHL, 14% και 27,1% αντίστοιχα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην έρευνα των Cavalheiro et al. (2020).

Οι Giromini et al. (2017) απομόνωσαν επίσης πεπτιδικά κλάσματα μεγέθους < 3 kDa ύστερα από *in vitro* πέψη (χρήση πεψίνης-παγκρεατίνης) πρωτεϊνών συμπυκνωμένου γάλακτος, απομονωμένων πρωτεϊνών και υδρολυμένων πρωτεϊνών ορού. Τα αποτελέσματα ACE-αναστολής σε υπόστρωμα FAPGG έδειξαν ποσοστά 25,20%, 49,20% και 48,30% αντίστοιχα. Στη μελέτη αυτή η ACE-αναστολή προσδιορίστηκε και στα δείγματα πριν την πέψη δίνοντας χαμηλότερες τιμές (10,79%, 19,50%, 23,39% αντίστοιχα) εκδηλώνοντας την επίδραση της πέψης στην ACE-ανασταλτική δράση πεπτιδικών κλασμάτων.

Επιπλέον, δεδομένου ότι πεπτίδια με ACE-ανασταλτική δράση προέρχονται τόσο από πρωτεΐνες ορού γάλακτος α-λακταλβουμίνη και β-λακτογλοβουλίνη (π.χ. λακτοκινίνες Leu-Arg-Pro., Leu-Lys-Pro) όσο και από καζεΐνες (καζοκινίνες π.χ. Val-Pro-Pro) (Κουτελιδάκης,

2015²), οι Otte *et al.* (2007) προσδιόρισαν την ACE-ανασταλτική δράση *in vitro* σε υδρολύματα καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού με διαφορετικά ένζυμα και διαφορετικούς χρόνους υδρόλυσης με χρήση υποστρώματος FAPGG. Η υδρόλυση με πεψίνη για διάστημα 3 ωρών (πλησιέστερος χρόνος στην *in vitro* πέψη της παρούσας μελέτης) έδειξε για τις καζεΐνες ACE-αναστολή με τιμές 73-80% (ανάλογα την καζεΐνη) ενώ για τις πρωτεΐνες ορού 79-85%.

Όσον αφορά την ACE-ανασταλτική δράση της *S. platensis*, η μελέτη των Yüçetepe *et al.* (2018) έδειξε πως τα υδρολύματα πρωτεϊνών της *S. platensis* με δράση τρυψίνης εμφάνισαν ACE-αναστολή πριν την πέψη 18% στις 4 ώρες υδρόλυσης με την μέγιστη αναστολή να εκδηλώνεται στις 8 ώρες υδρόλυσης και να έχει τιμή 21,79%. Η περαιτέρω πέψη των υδρολυμάτων έδωσε υψηλότερες τιμές και συγκεκριμένα οι 4 ώρες υδρόλυσης είχαν αναστολή 28% ενώ μέγιστη αναστολή εκδηλώθηκε στις 6 ώρες υδρόλυσης με τιμή 32%. Οι τιμές αυτές φαίνεται να μην υπερβαίνουν τις αντίστοιχες των δειγμάτων PSB (61,7%) και PSE (62,9%) της παρούσας μελέτης έπειτα από 2 ώρες πέψης με πεψίνη και 2 ώρες με παγκρεατίνη και χολικά άλατα.

Αντιθέτως, η *in vitro* πέψη φυκομπιλοπρωτεΐνης της *S. platensis* με συγκεντρώσεις 0,1, 0,5 και 1 mg /mL με πεψίνη, έδειξε ACE-αναστολή σε υπόστρωμα HHL 40%, 80% και 98% αντίστοιχα ενώ με τρυψίνη 28%, 60% και 78% αντίστοιχα (Liu & Fu, 2022). Οι Arslan & Aksay (2021) προσδιόρισαν επίσης την ACE-αναστολή σε εναιώρημα 10% σκόνης *S. platensis* και σκόνης φυκοκυανίνης, με έκβαση 92,40% και 89,50% αντίστοιχα σε υπόστρωμα HHL ύστερα από HPLC ανάλυση.

Εκτός από τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια για τις βιολογικές τους ιδιότητες έχουν αναφερθεί και τα λιπίδια και λιπαρά οξέα (π.χ. ω-3, ω-6) των μικροφυκών (Gumus & Gharibzahedi, 2021; Pekkoh *et al.*, 2022). Συγκεκριμένα, ACE-ανασταλτική δράση λιπαρών οξέων και λιπιδίων έχουν εντοπίσει οι Verspreet *et al.* (2021) και Pekkoh *et al.* (2022) σε διάφορα είδη μικροφυκών. Μάλιστα, οι Verspreet *et al.* (2021) αναφέρουν ποσοστά ACE-αναστολής λιπιδίων, ύστερα από *in vitro* πέψη, 73,4-87,1%. Ωστόσο, είναι λίγα τα διαθέσιμα δεδομένα που αναφέρονται στους μηχανισμούς δράσης μεταξύ λιπαρών οξέων μικροφυκών και ενζύμου ACE.

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται πως τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών όσον αφορά την εκδήλωση ACE-ανασταλτικής δράσης από πεπτίδια πρωτεϊνών της *S. Platensis* και προϊόντων ζύμωσης του γάλακτος όπως το γιαούρτι, με ορισμένες διαφορές στις ποσοστιαίες τιμές της ACE-αναστολής. Οι παρατηρούμενες αυτές διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την ACE-ανασταλτική δράση των πεπτιδίων όπως η διαδικασία εκχύλισης των πρωτεϊνών, οι παράμετροι της διαδικασίας πέψης (ένζυμα, pH, χρόνος, θερμοκρασία), η διαδικασία κλασμάτωσης και το μέγεθος των πεπτιδίων που απομονώθηκε, η

μέθοδος ανάλυσης που εφαρμόστηκε, το είδος του δείγματος τροφίμου και οι πρώτες ύλες του (π.χ. για το γιαούρτι η ζωική προέλευση του γάλακτος και οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες) (Yüçetepe *et al.*, 2018; Arslan & Aksay 2021). Ειδικότερα, η ACE-ανασταλτική δράση των πεπτιδίων επηρεάζεται από το είδος της πρωτεΐνης προέλευσης το μέγεθος και την αλληλουχία αμινοξέων του πεπτιδίου, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από το ένζυμο που δρα στην πρωτεΐνη (Ye *et al.*, 2022). Οι Giromini *et al.* (2017) αναφέρουν πως τα ένζυμα που παράγουν υψηλή συγκέντρωση πεπτιδίων με ACE-ανασταλτική δράση *in vitro* από φυτικές πρωτεΐνες είναι η πεψίνη, ενώ από πρωτεΐνες γάλακτος, ο συνδυασμός πεψίνης-παγκρεατίνης. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά πρέπει να τεκμηριωθούν και από *in vivo* μελέτες. Άλλος ένας βασικός παράγοντας για την εκδήλωση της ACE-ανασταλτικής δράσης από τα πεπτίδια είναι η ανθεκτικότητά τους στην πέψη και η βιοδιαθεσιμότητά τους. Για να δράσουν αποτελεσματικά ως ACE- αναστολείς *in vivo*, τα πεπτίδια με αυτή τη δράση πρέπει να περάσουν άθικτα από το εντερικό επιθήλιο στην κυκλοφορία του αίματος και από εκεί στο όργανο-στόχο (Yüçetepe *et al.*, 2018; Giromini *et al.*, 2019). Τα ένζυμα της πέψης αποικοδομούν τα πεπτίδια και μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αδρανοποιήσουν την βιολειτουργική τους δράση (Yüçetepe *et al.*, 2018). Συνεπώς, η ACE-δράση που παρατηρείται *in vitro* πιθανώς να μην αντιστοιχεί πλήρως στην αντίστοιχη *in vivo* λόγω του παράγοντα της βιοδιαθεσιμότητας (Giromini *et al.*, 2019). Οι Williams *et al.* (2014) υποστηρίζουν πως ένας μικρός αριθμός πεπτιδίων από πρωτεΐνες γάλακτος με αποδεδειγμένη αντιυπερτασική δράση είναι κλινικά αποτελεσματικά και *in vivo*. Για να περιοριστεί η απόκλιση αυτού του παράγοντα, στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε *in vitro* πέψη και κλασμάτωση πεπτιδίων μεγέθους < 3 kDa, με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (Giromini *et al.*, 2019), που προσομοιάζει αρκετά την *in vivo* πέψη και απορρόφηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης πως η ACE-ανασταλτική δράση του γιαουρτιού-μάρτυρα (YC) και των δειγμάτων PSB και PSE ήταν αυξημένη με στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τα δείγματα επιδορπίου γιαουρτιού YSB και YSE κατά περίπου 10%, κάτι το οποίο δεν ισχύει για το δείγμα YL το οποίο δεν εκδήλωσε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το YC. Έτσι, φαίνεται πως ο εμπλουτισμός του γιαουρτιού με βιομάζα *S. Platensis* ή πρωτεϊνικό εκχύλισμά της προκαλεί μικρή μείωση στην ικανότητα των πεπτιδικών κλασμάτων τους να παρεμποδίζουν την δράση του ACE σε σχέση με τα αποτελέσματα ACE-αναστολής του κάθε προϊόντος ξεχωριστά. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός δράσης των ACE-ανασταλτικών πεπτιδίων περιλαμβάνει την πρόσδεσή τους στα ενεργά κέντρα του ενζύμου ή σε κάποια άλλη περιοχή, παρεμποδίζοντας έτσι την σύνδεσή του με το υπόστρωμα ή μειώνοντας την καταλυτική του δράση αντίστοιχα (Sato *et al.*, 2002; Tomovska *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022), είναι πιθανό στο υβριδικό προϊόν τα πεπτίδια του ενός τροφίμου να αλληλεπιδρούν με πεπτίδια ή άλλα συστατικά (π.χ. υδατάνθρακες, λίπη ή δομικές μονάδες

αυτών) του άλλου και αυτό να μεταβάλει ελαφρώς στην ικανότητα πρόσδεσής τους στο ένζυμο (Κουτελιδάκης, 2015¹). Ένας επιπλέον βασικός παράγοντας, που επιδρά τόσο στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά όσο και στα λειτουργικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, είναι το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας των επιδορπίων γιαουρτιού στο οποίο γίνεται η προσθήκη των μικροφυκών ή των συστατικών της π.χ. πριν ή μετά τη ζύμωση του γάλακτος. Η μελέτη των Atallah *et al.*, (2020) έδειξε πως η προσθήκη της *S. platensis* πριν τη ζύμωση προκάλεσε αύξηση στα ολικά στερεά, στο λίπος και τη πρωτεΐνη του εμπλουτισμένου προϊόντος σε σχέση με το γιαούρτι-μάρτυρα. Σε αυτήν την περίπτωση, τα συστατικά της σπιρουλίνας (υδατάνθρακες, λίπος, πρωτεΐνες) είναι διαθέσιμα προς αξιοποίηση από την οξυγαλακτική καλλιέργεια κατά το στάδιο της ζύμωσης, με πιθανό αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης βιοενεργών συστατικών που παράγονται ως προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Από την άλλη, στην περίπτωση προσθήκης του μικροφύκου μετά τη ζύμωση του γάλακτος τα συστατικά της σπιρουλίνας συμβάλουν κυρίως στη διατήρηση της βιωσιμότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου (Hernandez *et al.*, 2022). Οι Da Silva *et al.*, (2019) μελέτησαν την προσθήκη της *S. platensis* μετά τη ζύμωση του γάλακτος και παρατήρησαν πως ενώ η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αυξήθηκε στο εμπλουτισμένο προϊόν συγκριτικά με το μάρτυρα, η περιεκτικότητα σε λίπος και υδατάνθρακες δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές.

Κατά την παρασκευή των δειγμάτων επιδορπίου γιαουρτιού της παρούσας μελέτης, η προσθήκη των συστατικών του μικροφύκου πραγματοποιήθηκε στο γάλα πριν το στάδιο επώασης και ζύμωσης. Το γεγονός αυτό μεταβάλει τη σύσταση της πρώτης ύλης και πιθανόν να επηρεάζει και την πορεία της ζύμωσης με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών προϊόντων, πεπτιδίων και βιοενεργών συστατικών με διαφορετική επίδραση στην ACE ανασταλτική δράση μετά την πέψη συγκριτικά με την δράση του κάθε προϊόντος ξεχωριστά. Συνεπώς, φαίνεται πως όλα τα δείγματα επιδορπίων γιαουρτιού εκδήλωσαν αντιυπερτασική δράση, ωστόσο η προσθήκη βιομάζας και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σπιρουλίνας στο γάλα για την παρασκευή του YSB και YSE αντίστοιχα φαίνεται να προκαλεί μικρή μείωση με στατιστικώς σημαντική διαφορά στην αντιυπερτασική δράση των δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα. YC, PSB και PSE. Συνεπώς, εκτενέστερη έρευνα είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του γιαουρτιού και της *S. platensis* καθώς και την επίδραση που αυτές ασκούν στην δραστηριότητα των βιοενεργών πεπτιδίων τους.

5.4. Διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου μικροφυκών

Η ανεπάρκεια σιδήρου αποτελεί σήμερα ένα από τα σημαντικότερα διατροφικά προβλήματα στον κόσμο, και μπορεί να προκληθεί τόσο από την έλλειψη του σιδήρου στις τροφές, όσο και από τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά του (Puyfoulhoux *et al.*, 2001). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση του εμπλουτισμού των μικροφυκών *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris* με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου (183 mg Fe/L και 61 mg Fe/L) στη διαλυτότητα-βιοδιαθεσιμότητά του.

Η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου μπορεί να οριστεί ως η ποσότητα του σιδήρου που απορροφάται από τον οργανισμό διαπερνώντας τα κύτταρα του εντέρου και είναι διαθέσιμο να αξιοποιηθεί από αυτόν για την κάλυψη των αναγκών του (Puyfoulhoux *et al.*, 2001). Ο δισθενής σίδηρος των τροφίμων παρουσιάζει υψηλότερη διαλυτότητα και απορροφάται πιο εύκολα από τον οργανισμό συγκριτικά με τον τρισθενή σίδηρο (Rana & Prajapati, 2021). Ως εκ τούτου, στην παρούσα εργασία η διαλυτότητα του σιδήρου προσδιορίστηκε από τη συγκέντρωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στο υπερκείμενο των φυγοκεντρημένων προϊόντων πέψης των μικροφυκών με τη μέθοδο της φερροζίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ενώ η συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου (Fe^{2+}) αυξήθηκε ανάλογα με τον εμπλουτισμό των δειγμάτων, η διαλυτότητα-βιοδιαθεσιμότητά του και για τα δύο είδη μικροφυκών και στις δύο συγκεντρώσεις σιδήρου, παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με το δείγμα-μάρτυρα (S.C.). Στην περίπτωση της σπιρουλίνας η διαφορά στη μείωση της διαλυτότητας από το μάρτυρα ήταν περίπου της τάξης του 10% και για τα δύο δείγματα (S. 183 και S.61) ενώ στη χλωρέλλα περίπου 4%. Εξάιρεση αποτέλεσε το δείγμα S.183 στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου σε σχέση με τον μάρτυρα.

Αντίστοιχα αποτελέσματα βρήκαν στην έρευνά τους οι Kougia *et al.* (2023), όπου η καλλιέργεια της *Spirulina platensis* σε μέσο ανάπτυξης εμπλουτισμένο με σίδηρο (20-244 mg Fe/L) από διαφορετικές πηγές (κιτρικός σίδηρος, $FeSO_4$, $FeCl_3$) αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητα του μικροφύκου σε σίδηρο (114 mg Fe/g βιομάζας) όταν χρησιμοποιήθηκε $FeCl_3$, ενώ η βιοπροσβασιμότητά του ήταν αρκετά χαμηλότερη (28 mg Fe/g βιομάζας).

Αξίζει να σημειωθεί πως κατά την εφαρμογή της μεθόδου βρέθηκε πως το μεγαλύτερο μέρος του ολικού Fe και στα δύο μικροφύκη καθιζάνει με το ίζημα του προϊόντος πέψης μετά τη φυγοκέντρωση, κάτι που έχει σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα της διαλυτότητάς του και πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα δύο είδη μικροφυκών προκύπτει πως το μη εμπλουτισμένο δείγμα της *Spirulina platensis* (Control) εμφανίζει μεγαλύτερη διαλυτότητα δισθενούς σιδήρου από το αντίστοιχο δείγμα της *Chlorella vulgaris* με διαφορά 7,3%. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αρκετά αυξημένη αρχική συγκέντρωση του δισθενούς σιδήρου στη σπιρουλίνα (38 μM) έναντι

της χλωρέλλας (6 μM), αλλά και όπως αναφέρουν οι Gao *et al.* (2019), στο ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα που διαθέτει η χλωρέλλα αλλά όχι η σπιρουλίνα και το οποίο μειώνει τις αποδόσεις πέψης του μικροφύκους και συνεπώς της διαθεσιμότητας σιδήρου. Συγκεκριμένα, οι Gao *et al.* (2019) συμπέραναν πως παρόλο που η περιεκτικότητα της χλωρέλλας σε σίδηρο ήταν τετραπλάσια από αυτήν της σπιρουλίνας, η τελευταία αποτέλεσε καλύτερο συμπλήρωμα σιδήρου, καθώς παρουσίασε μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητά του όταν χορηγήθηκε σε αρουραίους με ανεπάρκεια σιδήρου.

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι:

Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες

- Η *Spirulina platensis* με 183 mg Fe/L επάγει την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων μέσω έκφρασης της ισχυρά αντί-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10, των γονιδίων TNF- α , IL-6, MCP-1 και του μεταγραφικού παράγοντα NF- κB .
- Η μείωση στην έκφραση της IL-10 με την αύξηση της συγκέντρωσης του Fe στη *Chlorella vulgaris*, υποδεικνύει μειωμένη απόκριση των κυττάρων στη φλεγμονή.
- Τα δείγματα επιδορπίων γιαουρτιού YSB και YSE εκδήλωσαν πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση μέσω μείωσης της έκφρασης του παράγοντα TGF- β , ενώ το δείγμα YL προκάλεσε προ-φλεγμονώδη απόκριση ενισχύοντας την έκφραση της προ-φλεγμονώδους IL-1 β συγκριτικά με το γιαούρτι μάρτυρα (YC).

Αντιυπερτασικές ιδιότητες

- Όλα τα υπό μελέτη δείγματα (YC, YSB, YSE, YL, PSB, PSE) έδειξαν υψηλή ACE-ανασταλτική δράση σε σχέση με το blank. Ωστόσο, τα δείγματα YSB και YSE εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση της ACE-ανασταλτικής δράσης σε σχέση με τα δείγματα YC, PSB και PSE.

Διαλυτότητα σιδήρου

- Ο εμπλουτισμός με Fe και για τα δύο είδη μικροφυκών φάνηκε να μειώνει σημαντικά τη διαλυτότητά του.

Κεφάλαιο 6^ο

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η *Arthrospira (Spirulina) platensis* μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο φυσικό συστατικό για την ενσωμάτωσή της σε τρόφιμα με πολλές προοπτικές στη χρήση της για παραγωγή καινοτόμων βιολειτουργικών τροφίμων προστιθέμενης θρεπτικής αξίας και με επιπλέον ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Επίσης, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία οι πρωτεΐνες της *Spirulina platensis* συνιστούν σημαντικές πηγές βιοενεργών πεπτιδίων με ιδιότητες όπως ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές κ.α., και μπορούν να βρουν εφαρμογή στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων.

Συγκεκριμένα, ο εμπλουτισμός γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης, όπως το γιαούρτι, με *Spirulina platensis* ή συστατικά της, προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την προαγωγή της υγείας μέσω ανάπτυξης ενός προϊόντος με ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες. Παράλληλα, παρέχει σημαντικές ευκαιρίες στις βιομηχανίες τροφίμων να διευρύνουν το πεδίο δραστηριοποίησής τους μέσω παραγωγής νέων βιολειτουργικών τροφίμων που καλύπτουν τις ανάγκες των καταναλωτών.

Ωστόσο, κατά την ανάπτυξη τέτοιων προϊόντων είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως α) η αλληλεπίδραση των συστατικών της σπιρουλίνας με τα αντίστοιχα του γιαουρτιού καθώς και οι επιπτώσεις της επίδρασης αυτής στην υγεία του καταναλωτή και στη βιωσιμότητα της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του γιαουρτιού, β) η βιοδιαθεσιμότητα και βιοπροσβασιμότητα των θρεπτικών και βιοενεργών συστατικών του προϊόντος, γ) η επίδραση του μικροφύκου στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, ώστε αυτό να είναι αποδεκτό από τον καταναλωτή ενώ ταυτόχρονα να εκδηλώνει τις βέλτιστες ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου καθώς και δ) το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας στο οποίο γίνεται η ενσωμάτωση του μικροφύκου ή των συστατικών της.

Ολοκληρώνοντας να αναφερθεί πως εκτενέστερη έρευνα είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των μηχανισμών δράσης των βιοενεργών πεπτιδίων και άλλων θρεπτικών συστατικών της σπιρουλίνας, τη μελέτη της σχέσης μεταξύ δομής και δραστηριότητας των πεπτιδίων, (και μάλιστα συγκεκριμένων αλληλουχιών με ανοσορυθμιστική και αντιυπερτασική δράση), καθώς και την επίδραση των πρωτεϊνών, πεπτιδίων και των υπόλοιπων συστατικών τόσο της σπιρουλίνας όσο και του γιαουρτιού στην έκφραση των γονιδίων. Είναι βασική η τεκμηρίωση της φυσιολογικής και ασφαλούς δράσης των πεπτιδίων στον οργανισμό σε βάθος χρόνου μέσω κλινικών μελετών μεγάλης διάρκειας σε ανθρώπους. Απαραίτητη είναι επίσης

και η καλύτερη γνώση των διαδικασιών υδρόλυσης και βιοδιαθεσιμότητας των πρωτεϊνών κατά την γαστρεντερική πέψη των τροφίμων, για τη βελτιστοποίηση των *in vitro* μοντέλων προσομοίωσής της. Τέλος, η περαιτέρω μελέτη της επίδρασης παραγόντων όπως σύσταση του μικροφύκου, ζωική προέλευση γάλακτος, θερμοκρασία διατήρησης και διάρκεια ζωής του προϊόντος στις ανοσορυθμιστικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες του, είναι σημαντική για την παραγωγή ενός ασφαλούς, ποιοτικού προϊόντος με επιπλέον οφέλη για την υγεία από τα προσδοκόμενα.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

Ανδρίτσος Ν. (2015). Προβιοτικά τρόφιμα και πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών. Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας., Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 11.

Αργύρη Κ. (2015). Η σημασία των βιοενεργών πεπτιδίων για την υγεία. Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας., Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 11.

Ζαμπέλας, Α. (2017). Κλινική διαιτολογία και διατροφή με στοιχεία παθολογίας. Αθήνα. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης- Broken Hill Publishers LTD.

Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου Γ. (2009). Συστατικά του γάλακτος. Στο Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου Γ. Γαλακτοκομία. Αθήνα. Εκδόσεις Έμβρυο. Κεφ. 2.

Κρέστος Β. & Ξενάκη Δ. (2015). Το νομοθετικό πλαίσιο των λειτουργικών τροφίμων: Ισχυρισμοί διατροφής και υγείας. Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας. , Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 5.

¹Κουτελιδάκης, Α. (2015). Βιοδραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων. Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας. , Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 3.

²Κουτελιδάκης, Α. (2015). Υπερτρόφιμα (superfoods): πρόσφατα δεδομένα για το ρόλο τους στην πρόληψη ασθενειών. Σπιρουλίνα (*Arthrospira platensis*). Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας. , Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 12.

Κώδικας τροφίμων, ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσης (ΚΤΠ), άρθρο 82, 2009. Γενικό Χημείο του Κράτους. Διαθέσιμο διαδικτυακά στο <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-07/82-iss2.pdf>.

Λέκκα, Μ., Λεονταρίτης, Γ., Γαλανοπούλου, Κ., & Κητσιούλη, Ε. (2015). *Άσκηση: Καλλιέργειες ζωικών κυττάρων: Καλλιέργεια και ενεργοποίηση κυτταρικής σειράς A549 από λιποπολυσακχαρίτη (LPS)* [Κεφάλαιο]. Στο Λέκκα, Μ., Λεονταρίτης, Γ., Γαλανοπούλου, Κ., & Κητσιούλη, Ε. 2015. *Βιολογικές μεμβράνες: από τη δομή στις λειτουργίες* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/4314>

Μάντης, Α., Παπαγεωργίου, Δ., Φλετούρης, Δ. & Αγγελίδης, Α., (2015). Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων του. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Α.Ε. Αφοί Κυριακίδη.

Μασούρας Θ. (2021). Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων. Οξυγαλακτικά Προϊόντα Γάλακτος. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.

Μοάτσου Γ., (2009). Βασικά γαλακτοκομικά προϊόντα. Στο Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου Γ. Γαλακτοκομία. Αθήνα. Εκδόσεις Έμβρυο. Κεφ. 10.

Μουντζούρης Κ. (2021). Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη Διατροφή των Ζώων. Μικροφύκη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Αθήνα.

Παλαιολόγου, Δ., Παπανικολάου, Γ., Κατσαρέλη, Ε. 2015. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίδα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., Δούκισσας, Λ. 2015. *Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/647>

ΠΟΥ. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Cardiovascular diseases (CVDs), key facts, Προσπελάθηκε στις 17 Μαΐου, 2017 [online]. Διαθεσιμο στο: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

Ξένη βιβλιογραφία

Abbas, A.K. Lichtman, AH. (2011). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia, Pa. London: Saunders Elsevier.

Abd El-Fattah, A., Sakr, S., El-Dieb, S., & Elkashef, H. (2018). Developing functional yoghurt rich in bioactive peptides and gamma-aminobutyric acid related to cardiovascular health. *LWT*, 98, 390-397.

Abdulqader, G., Barsanti, L. & Tredici, M.R. (2000) Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Journal of Applied Phycology* 12, 493-498.

Abo-Shady, A. M., Mohamed, Y. A., & Lasheen, T. (1993). Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia plantarum*, 35, 629-632.

Absher, M. (1973). Hemocytometer counting. In *Tissue culture* (pp. 395-397). Academic Press.

Acien, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts: From feedstock cultivation to end-products*.

Agyei, D., & Danquah, M. K. (2012). Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 62-69.

Ahmad, I., Yanuar, A., Mulia, K., & Mun'im, A. (2017). Review of angiotensin-converting enzyme inhibitory assay: Rapid method in drug discovery of herbal plants. *Pharmacognosy reviews*, 11(21), 1.

Ahmad, M. T., Shariff, M., Yusoff, F. Md., Goh Y. M., & Banerjee, S. (2020). 'Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture', *Reviews in Aquaculture*, 12(1), pp. 328–346.

Akihiko Y., Yu W., Tomoaki M., (2010). Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β , *The Journal of Biochemistry*, Volume 147, Issue 6, June, Pages 781–792.

Al-Dhabi, N. (2013). Heavy metal analysis in commercial *Spirulina* products for human consumption. *Saudi journal of Biological Sciences*, 20(4):383-388.

Ali, M., Kamal, M., Rahman, M., Siddiqui, M., Haque, M., & Saha, K. K. (2022). Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: Current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 59(4), 1263-1279.

- Allen, L. H. (2002). Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *The Journal of nutrition*, 132(4), 813S-819S.
- Allouche, R., Hafeez, Z., Papier, F., Dary-Mourot, A., Genay, M., & Miclo, L. (2022). In vitro anti-inflammatory activity of peptides obtained by tryptic shaving of surface proteins of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Foods*, 11(8), 1157.
- Anekthanakul, K., Senachak, J., Hongsthong, A., Charoonratana, T., & Ruengjitchachawalya, M. (2019). Natural ACE inhibitory peptides discovery from *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) strain C1. *Peptides*, 118, 170107.
- Arena, M. P., Caggianiello, G., Russo, P., Albenzio, M., Massa, S., Fiocco, D., & Spano, G. (2015). Functional starters for functional yoghurt. *Foods*, 4(1), 15-33.
- Argyri, K., A. Birba, D.D. Miller, M. Komaitis, M. Kapsokefalou. (2009). 'Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments', *Food Chemistry*, 113(2), pp. 602–607.
- Argyri, K., Komaitis, M. and Kapsokefalou, M. (2006). 'Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion', *Food Chemistry*, 96(2), pp. 281–289.
- Armstrong, M.T., Pardy, R.L., Child, A., Wainwright, N. (2002). Immunohistochemical demonstration of a lipopolysaccharide in the cell wall of a eukaryote, the green alga, *Chlorella*. *Biology Bulletin* 203: 203–204.
- Arslan, R., Eroglu, E. C., & Aksay, S. (2021). Determination of bioactive properties of protein and pigments obtained from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), e15150.
- Ashar, M. N., & Chand, R. (2004). Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, 59(7-8), 363-366.
- Atallah, A., Morsy, O. & Dalia, G. (2020). Characterization of functional low-fat yoghurt enriched with whey protein concentrate, Ca-caseinate and *Spirulina*. *Int. J. Food Prop.* 23, 78–91.
- Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., & Abdelkafi, S. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yoghurt during fermentation and storage. *LWT*, 84, 323-330.
- Barron B., Torres-Valencia J., Chamorro-Cevallos G. & Zuniga-Estrada A. (2008). *Spirulina* as an antiviral agent. In Belay, G., Belay, A. (2008). *Spirulina in human nutrition and health*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 227-242.
- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Haratian, P., & Darani, K. K. (2012). Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yoghurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology*, 235(4), 719-728.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 144-154.

- Belay, A. (2008). *Spirulina (Arthrospira): Production and quality assurance in "Spirulina in Human Nutrition and Health"* Edited by M.E. Gershwin and Amha Belay, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 1-25.
- Belay, A. Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu H. (1993). 'Current knowledge on potential health benefits of Spirulina', *Journal of Applied Phycology*, 5(2), pp. 235–241.
- Belay, A. (2002). The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Am. Nutraceutical. Assoc.* 5(2), 27–48.
- Bharathiraja, B., M. Chakravarthy, R. Ranjith Kumar, D. Yogendran, D. Yuvaraj, J. Jayamuthunagai, R. Praveen Kumar, S. Palani. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 47, Pages 634-653.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B. & O'Shea, K. S. (2015). Real-time PCR handbook. *Lab Chip*, 4(2), 189-200.
- Borowitzka, M., (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), pp.313–321.
- Bosshart, H. & Heinzelmann, M. (2016). 'THP-1 cells as a model for human monocytes', *Annals of Translational Medicine*, 4(21), pp. 4–7.
- Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M.J, Faas, M.M. (2004) 'Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans', *American Journal of Reproductive Immunology*, 52(1), pp. 19–26.
- Braesch-Andersen, S., Paulie, S., Smedman, C., Mia, S., & Kumagai-Braesch, M. (2013). ApoE production in human monocytes and its regulation by inflammatory cytokines. *PLoS One*, 8(11), e79908. doi:10.1371/journal.pone.0079908
- Brandelli, A., Daroit, D. J. and Corrêa, A. P. F. (2015). 'Whey as a source of peptides with remarkable biological activities', *Food Research International*, 73, pp. 149–161.
- Brányiková, I., Marsalková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bisova, K., Vilem Zachleder, Milada Vítová. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), pp.766–776.
- Brennan, L. & Owende, P., (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), pp.557–577.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., et al. (2019). "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion". *Nature Protocols*. 14 (4): 1–24.
- Bui, T. M., Wiesolek, H. L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of leukocyte biology*, 108(3), 787-799.
- Camacho, F., Macedo, A., Malcata, F. (2019). Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Mar. Drugs*, 17, 312.

- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., & Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology*, 125(3), 286-292.
- Cavalheiro, F. G., Baptista, D. P., Galli, B. D., Negrão, F., Eberlin, M. N., & Gigante, M. L. (2020). High protein yoghurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 333, 127482.
- Cha, K. H., Koo, S. Y., & Lee, D. U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10521-10526.
- Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D. G., Lee, D. U., & Pan, C. H. (2010). Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2), 793-797.
- Chalamaiah, M., Yu, W. & Wu, J. (2018). ‘Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review’, *Food Chemistry*, 245 (September 2017), pp. 205–222.
- Challem, J.J., Passwater, R.A., & Mindell, E.M. (1981). “Spirulina” Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut.
- Chandan, R. C. (2017). *An overview of yoghurt production and composition, Yoghurt in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc.
- Chandan, R. C., & O’Rell, K. R. (2006). Manufacture of various types of yoghurt. *Manufacturing yoghurt and fermented milks*, 211-236.
- Chang, C. P., Su, Y. C., Lee, P. H., & Lei, H. Y. (2013). Targeting NFκB by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation. *Autophagy*, 9(4), 619-621.
- Chanput, W. (2012). Immunomodulating effects of food compounds: a study using the THP-1 cell line. [dissertation]. Wageningen University, Wageningen, NL. Διαθέσιμο στο: <https://core.ac.uk/download/pdf/29225531.pdf>
- Chanput, W., Mes, J.J., Savelkoul H.F.J., & Wichers, H.J. (2013). ‘Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds’, *Food and Function*, 4(2), pp. 266–276.
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R.A., Savelkoul, H.F., Wichers, H.J. (2010). ‘Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds’, *Food and Function*, 1(3), pp. 254–261.
- Chanput, W., Mes, J., & Wichers, H. J. (2014). ‘THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach’, *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37–45.
- Chun, S. H., Lee, H. A., Lee, K.B., Kim, S. H., Park, K. Y., Lee, K. W. (2016) ‘Effects of glycosylated whey protein concentrate on pro-inflammatory cytokine expression and phagocytic activity in RAW264.7 macrophages’, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(2), pp. 199–206.
- Chaumont, D., (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(6), pp.593–604.

Cheng, Y.L., Juang, Y.C., Liao, G. Y., Ho, S.H., Yeh, K. L., Chen, C.Y., Chang, J.S., Liu, J.C., Lee, D.J. (2010). Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 23, Pages 9092-9096.

Chen, H. W., Yang, T. S., Chen, M. J., Chang, Y. C., Eugene, I., Wang, C., & Liao, P. C. (2014). Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochemistry*, 49(8), 1337-1344.

Chobert, J. M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarondo, M., Métro, F., Choiset, Y., & Haertlé, T. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Le Lait*, 85(3), 141-152.

Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47, 551-578.

Ciferri, O. & Tiboni, O. (1985). The Biochemistry and Industrial Potention of *Spirulina* Ann. Rev. Microbiology, Department of Genetics and Microbiology, University of Pavia, Italy 89, 503- 526.

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2013). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ: Μια Μοριακή Προσέγγιση (Επίτομη έκδοση) Αλεξανδρούπολη. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. Κεφ. 4.

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

Coste M, Rochet V, Leonil J, Moll, Bouhallab S & Tome D. (1992). Identification of C-terminal peptides of bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol Lett* 33:41–46.

Csernok, E., Szymkowiak, C. H., Mistry, N., Daha, M. R., Gross, W. L., & Kekow, J. (1996). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 105(1), 104–111.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., Dockrel, D. H. (2010). ‘The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages’, *PLoS ONE*, 5(1).

Danone Nutricia Research. Global Yoghurt Consumption Per Capita and Per Year. The NutriJournal Web site. December 30, (2013). <http://nutrijournal.danone.com/en/articles/stories/global-yoghurt-consumption-per-capita-and-per-year>. Accessed October 5, 2014.

Dargahi, N., Johnson, J. C., & Apostolopoulos, V. (2021). Immune modulatory effects of probiotic *Streptococcus thermophilus* on human monocytes. *Biologics*, 1(3), 396-415.

Da Silva, M. S., & Rudkowska, I. (2015). Dairy nutrients and their effect on inflammatory profile in molecular studies. *Molecular nutrition & food research*, 59(7), 1249-1263.

- Da Silva, S.C., Fernandes, I.P., Barros, L., Fernandes, Â., Alves, J.M., Calhella, R.C. (2019). Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yoghurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *J. Funct. Foods*, 60, 103427.
- Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, 128, 241–245.
- Day, J.G., Slocombe, S.P. & Stanley, M.S., (2012). Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresource technology*, 109, pp.245–51. Διαθέσιμο στο: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411006936>.
- De-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 54, Issue 2, Pages 197-203.
- Deeth, H. C., & Tamime, A. Y. (1981). Yoghurt: Nutritive and therapeutic aspects. *Journal of food protection*, 44(1), 78-86.
- Deprez, R. H. L., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M., & Moorman, A. F. (2002). Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical biochemistry*, 307(1), 63-69.
- Dinarello C.A. (1997). Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 11(3):91-103.
- Diniz, A. F. A., de Oliveira Claudino, B. F., Francelino, D. M. C., Junior, E. B. A., Ferreira, P. B., Júnior, F. F. L., & da Silva, B. A. (2023). *Arthrospira platensis* prevents oxidative stress and suppresses IL-1 β expression in the ileum of rats fed a hypercaloric diet. *Journal of Functional Foods*, 106, 105586.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International dairy journal*, 17(11), 1321-1331.
- Dotti, I. & Bonin, S. (2011). DNase Treatment of RNA. In: Stanta G. (eds) *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dziembowska, M., & Wlodarczyk, J. (2012). MMP9: a novel function in synaptic plasticity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(5), 709-713.
- Edelmann, M., Aalto, S., Chamlagain, B., Kariluoto, S., Piironen, V. (2019). Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 82.
- El-Fattah, A.A., Sakr, S., El-Dieb, S., Elkashef, H. (2018). Developing functional yoghurt rich in bioactive peptides and gamma-aminobutyric acid related to cardiovascular health. *LWT Food Sci Technol* 98:390–397.

- El-Sattar, A., Ghafar, N. A., & Ali, A. H. (2021). Impact of Functional Stirred Low Fat Yoghurt Supplemented With *Spirulina platensis* Powder on Some Quality Characteristics and Therapeutic Effects In Vivo. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 12(4), 99-110.
- Elsonbaty, S. M., & Ismail, A. F. (2020). Nicotine encourages oxidative stress and impairment of rats' brain mitigated by *Spirulina platensis* lipopolysaccharides and low-dose ionizing radiation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 689, 108382.
- Fabisik, M., Tureckova, J., Pavliuchenko, N., Kralova, J., Balounova, J., Vicikova, K., & Brdicka, T. (2021). Regulation of inflammatory response by transmembrane adaptor protein LST1. *Frontiers in Immunology*, 12, 618332.
- Falquet, J. (1988). 'The Nutritional Aspects of Spirulina', *Antenna Technologies*, pp. 40–41.
- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., Zhang, X. (2014) Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222.
- FAO/WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. In : Report of joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived From Biotechnology.
- Farrar, W.V. (1966). Tecuitlatl: a glimpse of Aztec food technology. *Nature* 211, 341-342.
- Fioramonti, J., Theodorou, V., & Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 711-724.
- Fisberg, M. & Machado, R. (2015). 'History of yoghurt and current patterns of consumption', *Nutrition Reviews*, 73, pp. 4–7. doi: 10.1093/nutrit/nuv020.
- Frank, P. G., & Lisanti, M. P. (2008). ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(3), H926-H927.
- Gallego, M., Mauri, L., Aristoy, M. C., Toldra, F., & Mora, L. (2020). Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 69.
- Gao, F., Guo, W., Zeng, M., Feng, Y., & Feng, G. (2019). Effect of microalgae as iron supplements on iron-deficiency anemia in rats. *Food & function*, 10(2), 723-732.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Bonache, M. A., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J. Martínez-Villaluenga, C., (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities, *Food Chemistry*, Volume 221, Pages 464-472.
- Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Van Driessche, G., Alexandraki, V., Anastasiou, R., & Tsakalidou, E. (2017). Evaluation of the antihypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity and other probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *International Dairy Journal*, 75, 10-21.
- German, J. B. (2014). The future of yoghurt: scientific and regulatory needs. *The American journal of Clinical nutrition*, 99(5), 1271S-1278S.

- Gershwin M. & Belay A. (2008). *Spirulina in human nutrition and health*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., Faghihzadeh, S., & Hassan, Z. M. (2011). Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. *Ocular immunology and inflammation*, 19(6), 401-412.
- Giannoglou, M., Andreou, V., Thanou, I., Markou, G., & Katsaros, G. (2022). High pressure assisted extraction of proteins from wet biomass of *Arthrospira platensis* (spirulina)—A kinetic approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 81, 103138.
- Giannoglou, M., Andreou, V., Thanou, I., Markou, G., & Katsaros, G. (2023). Kinetic study of the combined effect of high pressure and pH-value on *Arthrospira Platensis* (Spirulina) proteins extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 85, 103331.
- Gilliland, S. E. (2001). Probiotics and prebiotics. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 327-344.
- Giordanino M. V. F., Strauch, S. M., Virginia, E. Villafañe, E., Helbling, W. (2011). Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 103, Issue 1, Pages 68-77.
- Giromini, C., Cheli, F., Rebucci, R., Baldi A. (2019). ‘Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier’, *Journal of Dairy Science*, 102(2), pp. 929–942.
- Giromini, C., Fekete, Á. A., Givens, D. I., Baldi, A., & Lovegrove, J. A. (2017). Short-communication: a comparison of the in vitro angiotensin-1-converting enzyme inhibitory capacity of dairy and plant protein supplements. *Nutrients*, 9(12), 1352.
- Gobetti, M., Minervini, F. & Rizello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides, *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-188.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2007). Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, 28(22), 4202-4211.
- Grzanna, R., Polotsky, A., Phan, P. V., Pugh, N., Pasco, D., & Frondoza, C. G. (2006). Immolina, a High-Molecular-Weight Polysaccharide Fraction of *Spirulina*, Enhances Chemokine Expression in Human Monocytic THP-1 Cells. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 12(5), 429-435.
- Gumus, C. E., & Gharibzahedi, S. M. T. (2021). Yoghurts supplemented with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids: New insights into the fortification, microencapsulation, quality properties, and health-promoting effects. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 267-279.
- Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington T. C., & Hasan R. M. (2008). *A Review on Culture , Production and Use of Spirulina As Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish*, No 103, Rome-Italy: FAO. Fisheries and Agriculture Circular.
- Ha, C. L., Lee, J. H., Zhou, H. R., Ustunol, Z., & Pestka, J. J. (1999). Effects of yoghurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse. *Journal of food protection*, 62(2), 181-188.

- Haque, E., Chand, R., & Kapila, S. (2009). Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, 25(1), 28-43.
- Hasegawa, T., Noda, K., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., & Yoshikai, Y. (2000). *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. *International journal of immunopharmacology*, 22(11), 877-885.
- Håversen, L., Danielsson, K. N., Fogelstrand, L., & Wiklund, O. (2009). Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis*, 202(2), 382-393.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I. (1996). Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 83-87.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19.
- Henda, Y. B., Labidi, A., Arnaudin, I., Bridiau, N., Delatouche, R., Maugard, T., & Bordenave-Juchereau, S. (2013). Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(45), 10685-10690.
- Henrikson, R. (1989) Earth Food Spirulina, Ronore Enterprises Publ.
- Hernandez, F. Y. F., Khandual, S., & López, I. G. R. (2017). Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(1), 14-19.
- Hernández, H., Nunes, M. C., Prista, C., & Raymundo, A. (2022). Innovative and Healthier Dairy Products through the Addition of Microalgae: A Review. *Foods*, 11(5), 755.
- Hermansen, K. (2000). Diet, blood pressure and hypertension. *British Journal of Nutrition*, 83(S1), S113-S119.
- Hernandez-Ledesma, B., Contreras, M.D.M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and in into foods. *Adv Colloid Interface Sci* 165:23–35.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1041-1048.
- He, X., Shu, J., Xu, L., Lu, C., Lu, A. (2012). ‘Inhibitory effect of Astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide- induced TNF- α and IL-1 β production in THP-1 cells’, *Molecules*, 17(3), pp. 3155–3164.
- He, Y.-Y., Li, T.-T., Chen, J.-X., She, X.-X., Ren, D.-F., & Lu, J. (2018). Transport of ACE inhibitory peptides ile-gln-pro and Val-glu-pro derived from spirulina platensis across caco-2 monolayers. *Journal of Food Science*, 83(10), 2586–2592.
- Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., Ui, M., & Seya, T. (2002). Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International immunopharmacology*, 2(4), 423-434.

- Holmquist, B., Bünning, P., & Riordan, J. F. (1979). A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical biochemistry*, 95(2), 540-548.
- Hu, S., Fan, X., Qi, P., & Zhang, X. (2019). Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *Journal of Functional Foods*, 56, 333–341.
- Hyrslava, I., Krausova, G., Smolova, J., Stankova, B., Branyik, T., Malinska, H., Huttl, M., Kana, A., Curda, L., & Duskocil, I. (2021). ‘Functional properties of chlorella vulgaris, colostrum, and bifidobacteria, and their potential for application in functional foods’, *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11), pp. 1–11.
- Hyrslava, I., Krausova, G., Smolova, J., Stankova, B., Branyik, T., Malinska, H., & Curda, L. (2021). Prebiotic and immunomodulatory properties of the microalga chlorella vulgaris and its synergistic triglyceride-lowering effect with bifidobacteria. *Fermentation*, 7(3), 125.
- Ivanova, K. G., Stankova, K. G., Nikolov, V. N., Radostina T. Georgieva, Kaledona M. Minkova, Lili G. Gigova, Ivanka T. Rupova, Rayna N. Boteva. (2010). The biliprotein C-phycoyanin modulates the early radiation response: A pilot study, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 695, Issues 1–2, Pages 40-45.
- Iyer S.S. & Cheng G. (2012) Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in immunology*; 32(1): 23-63
- Janssens, S., & Beyaert, R. (2002). A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends in biochemical sciences*, 27(9), 474-482.
- Jayati, T., Mounika Aila, D.P. Bangwal, Savita Kaul, M.O. Garg. (2015). Algae based biorefinery—How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 47, Pages 295-307.
- Jones P. & Jew S. (2007). Functional Food Development. Concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 387-390.
- Kaggwa, M. N., Burian, A., Oduor, S.O. & Schager M. (2013). ‘Ecomorphological variability of *Arthrospira fusiformis* (Cyanoprokaryota) in African soda lakes’, *MicrobiologyOpen*, 2(5), pp. 881–891.
- Kanekanian A. (2014). *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Cardiff Metropolitan University, UK, WILEY Blackwell.
- Kang, H. K., Lee, H. H., Seo, C. H., & Park, Y. (2019). Antimicrobial and immunomodulatory properties and applications of marine-derived proteins and peptides. *Marine Drugs*, 17(6), 350.
- Kaplan, N. M. (2000). Θεραπεία της Υπέρτασης. *Φαρμακευτική αντιμετώπιση-Φουροσεμίδη. Kaplan NM. Κλινική Υπέρταση. 7η Έκδοση. Εκδόσεις Αρχιπέλαγος. Αθήνα, 237.*
- Kaur, A., Lee, L. H., Chow, S. C., & Fang, C. M. (2018). IRF5-mediated immune responses and its implications in immunological disorders. *International reviews of immunology*, 37(5), 229-248.
- Khan, Z., Bhadouria, P. & Bisen, P.S. (2005). ‘Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*’, *Department of Biotechnology*, J.C. Bose Institute of Life Sciences, Bundelkhand University, Jhansi 284128, U.P., India.

- Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral blood mononuclear cells. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 161-167.
- Kopanos, G. M., Puigjaner, L. & Georgiadis, M. C. (2010). 'Optimal production scheduling and lot-sizing in Yoghurt production lines', *Computer Aided Chemical Engineering*, 28(C), pp. 1153–1158.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). 'Bioactive peptides: Production and functionality', *International Dairy Journal*, 16(9), pp. 945–960.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13 (8), 829–843.
- Kougia, E., Ioannou, E., Roussis, V., Tzovenis, I., Chentir, I., & Markou, G. (2023). Iron (Fe) biofortification of *Arthrospira platensis*: Effects on growth, biochemical composition and in vitro iron bioaccessibility. *Algal Research*, 70, 103016.
- Kim, N.-H, Jung, S.-H., Kim, J., Kim, S.H., Ahn, H.-J. Song, K.K. (2014). Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57(1), 91–95.
- Kim, S., & Karin, M. (2011). Role of TLR2-dependent inflammation in metastatic progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), 191-206.
- Kim, S.-K. & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*. 2(1), 1–9.
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
- Korhonen, H., Pihlanto-leppa, A., Rantama, P. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 307–319.
- Kris-Etherton P., Hecker, K., Bonanome, A., Coval, S., Binkoski, A., Hilpert, K., Griel, A., & Etherton T. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 30, 71s-88s.
- Kulshreshtha, A., Anish Zacharia J.a, Urmila Jarouliyaa, Pratiksha Bhadauriyaa, G.B.K.S. Prasada & P.S. Bisen (2008). 'Spirulina in Health Care Management', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(5), pp. 400–405.
- Kwak, N. & Jukes, D. (2001). Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.
- Lafarga, T. (2019a). Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products, *Algal Research*, Volume 41,101566.
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J.M.,González-López, C., Acien-Fernández, F.G. (2020). 'Spirulina for the food and functional food industries', *Food Research International*, 137 (April), p. 109356.
- Lafarga, T., Sanchez-Zurano, A., Villaro, S., Morillas-Espana, A., Acien, G., (2021). 'Industrial production of spirulina as a protein source for bioactive peptide generation', *Trends in Food Science and Technology*, 116(June), pp. 176–185.

- Lebsky, V. K., Gonzalez-Bashan, L. E. and Bashan, Y. (2001). ‘ Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* ’, *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), pp. 1–8.
- Lee, C. J., An, H. J., Cho, E. S., Kang, H. C., Lee, J. Y., Lee, H. S., & Cho, Y. Y. (2020). Stat2 stability regulation: an intersection between immunity and carcinogenesis. *Experimental & molecular medicine*, 52(9), 1526-1536.
- Lee, S. Y., & Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food chemistry*, 228, 506-517.
- Leister P.K., Huang R., Goodwin L. B., Chen A., Austin P. C., & Xia M. (2011). Two High Throughput Screen Assays for Measurement of TNF- α in THP-1 Cells, *Curr Chem Genomics*. 2011; 5: 21–29.
- Liang, N., Beverly, R. L., Scottoline, B. P., & Dallas, D. C. (2022). Peptides derived from in vitro and in vivo digestion of human milk are immunomodulatory in THP-1 human macrophages. *The Journal of Nutrition*, 152(1), 331-342.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31, 1043-1049.
- Lisboa, C. R., Aline, M. P. & Jorge, A. V. C. (2016). ‘Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18’, *African Journal of Microbiology Research*, 10(3), pp. 79–86.
- Liu, J., Bai, X., & Fu, P. (2022). In silico and in vitro assessment of bioactive peptides from *Arthrospira platensis* phycobiliproteins for DPP-IV inhibitory activity, ACE inhibitory activity, and antioxidant activity. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1497-1511.
- L'homme, L., Esser, N., Riva, L., Scheen, A., Paquot, N., Piette, J., & Legrand-Poels, S. (2013). Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages [S]. *Journal of lipid research*, 54(11), 2998-3008.
- Lucarini, M. (2017). ‘Bioactive Peptides in Milk: From Encrypted Sequences to Nutraceutical Aspects’, *Beverages*, 3(4), p. 41.
- Lucas, K. & Maes, M. (2013). Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical Cycle in Chronic Inflammation: Possible Treatments Targeting the TLR4 Pathway. *Mol Neurobiol* 48, 190–204.
- Lu, J., Ren, D. F., Xue, Y. L., Sawano, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *spirulina platensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7166–7171
- ¹Lu, J. Sawano, Y. Miyakawa, T. Xue, Y.L. Cai, M.Y. Egashira, Y. Ren, D.F. Tanokura, M. (2011). One-week antihypertensive effect of Ile-Gln-Pro in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 59(2), 559–563.
- ²Lu, J.; Yang, Y.; Lin, C.; Di-Feng, R.; Mu-Yi, C.; Jian-Zhong, W.; Yukari, E.; Masaru, T. (2011). In vivo antihypertensive effect of Val-Glu- Pro in spontaneously hypertensive rats. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan.* 38(4), 353–360.

- ³Lu, J.; Ren, D.F.; Wang, J.Z.; Tanokura, M. (2011). Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from *Spirulina platensis*. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*. 2010, 37, 568–574.
- Lund, M.E., Joyce T., Bronwyn A., O'Brien, Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus, *Journal of Immunological Methods*, Volume 430, Pages 64-70.
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 956-964.
- Maham, K., Escott-Stump S. (2000). Krause 's Food, Nutrition and Diet Therapy, 10th edition. W.B Saunders Company, U.S.A.
- Mani, U., Desai, S., & Iyer U. (2000). Studies on the long-term effect of spirulina supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients. *Journal of Nutraceuticals, Functional, Medical Foods*, 2(3), 25-32.
- Marcil, V., Lavoie, J. C., Emonnot, L., Seidman, E., & Levy, E. (2011). Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. *Clinical biochemistry*, 44(10-11), 873-883.
- Markell, L. K., Wezalisa, S. M., Ropera, J. M., Zimmermannb, C., Delaneyb, B. (2017). 'Incorporation of in vitro digestive enzymes in an intestinal epithelial cell line model for protein hazard identification', *Toxicology in Vitro*, 44(June), pp. 85–93.
- Martínez-Palma, N., Martínez-Alaya, A. & Dávila-Ortiz, G. (2015). 'Determination of Antioxidant and Chelating Activity of Protein'. Instituto Politecnico Nacional. Prol. Carpio, Esq. Plan de Ayala S/N, Col. Casco de Santo Tom 'as, Del. Miguel Hidalgo, 11340 Mexico.
- Mendes, R.L., Fernandes, H.L., Coelho, J.P., Reis, E.C., Cabral, J.M., Novais, J.M. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem*. 53(1):99-103.
- Meydani, S. N., & Ha, W. K. (2000). Immunologic effects of yoghurt. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 861-872.
- Millán-Linares, M. del C., Bermúdez B., Yust M. del M., Millán F., Pedroche J. (2014) 'Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages', *Journal of Functional Foods*, 8(1), pp. 224–233.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., *et al.* (2014). 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus', *Food and Function*, 5(6), pp. 1113–1124.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5297-5305.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P.S. (2016). 'Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), pp. 577–583. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005.

- Molina, E., J. Fernández, F.G. Acién, Y. Chisti (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), pp.113–131.
- Morris, H. J., Carrillo, O. V., Almarales, A., Bermúdez, R. C., Alonso, M. E., Borges, L., Quintana, M., Fontaine, R., Llauradó, G., Hernández, M. (2009). ‘Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with the potentialities in immunonutrition’, *Biotechnologia Aplicada*, 26(2), pp. 162–165.
- Morris, H. J. Carrillo, O. V., Almarales, A., Bermúdez, R. C., Lebeque, Y., Fontaine, R., Llauradó, G., Beltran, Y. (2007). ‘Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice’, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), pp. 456–460.
- Moschopoulou, E., Sakkas, L., Zoidou, E., Theodorou, G., Sgouridou, E., Kalathaki, C., & Moatsou, G. (2018). Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. *International dairy journal*, 77, 47-55.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.
- Murray, B. A., Walsh, D. J., & FitzGerald, R. J. (2004). Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), 127-137.
- Nakamura, T., Hirota, T., Mizushima, K., Ohki, K., Naito, Y., Yamamoto, N., & Yoshikawa, T. (2013). Milk-derived peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice: a preliminary study. *Journal of medicinal food*, 16(5), 396-403.
- Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Wijesekara, I., Kim, S.-K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 51(4), 378–383.
- Niccolai, A., Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Res.*, 42, 101617.
- Nielsen, S. S. (2017). *Food analysis laboratory manual*. Purdue University West Lafayette, IN, USA . Springer.
- Ogbonda, K. H., Rebecca E. Aminigo, Gideon O. Abu, (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp., *Bioresource Technology*, Volume 98, Issue 11, Pages 2207-2211.
- Okabe, Y. & Medzhitov, R. (2014) ‘Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages’, *Cell*, 157(4), pp. 832–844.
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in immunology*, 3, 79.
- O'Neill, L. A. J. (2003). The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 643-647.

- Ong, L., & Shah, N. P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(9), 1555-1566.
- Opal S. M. & DePalo V.A. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest*. Volume 117, Issue 4. Pages 1162-1172.
- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., & El-Shabrawy, S. A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, *17*(5), 488-503.
- Ovando, C. A., Julio Cesar de Carvalho, Gilberto Vinícius de Melo Pereira, Philippe Jacques, Vanete Thomaz Soccol & Carlos Ricardo Soccol (2018). 'Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review', *Food Reviews International*, *34*(1), pp. 34–51. doi: 10.1080/87559129.2016.1210632.
- Pan, H., She, X., Wu, H., Ma, J., Ren, D., & Lu, J. (2015). Long-term regulation of the local Renin-angiotensin system in the myocardium of spontaneously hypertensive rats by feeding bioactive peptides derived from spirulina platensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7765–7774.
- Pan-utai, W., Atkonghan, J., Onsamark, T., & Imthalay, W. (2020). Effect of Arthrospira Microalga Fortification on Physicochemical Properties of Yoghurt. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, *8*(2), 531-540.
- Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A. M., Malcata, F. X., & Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food chemistry*, *105*(2), 647-656.
- Parages, M. L., Rico, R. M., Abdala-Díaz, R. T., Chabrilón, M., Sotiroudis, T. G., & Jiménez, C. (2012). Acidic polysaccharides of Arthrospira (Spirulina) platensis induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages. *Journal of applied phycolgy*, *24*, 1537-1546.
- Park, C., Li, S., Cha, E., & Schindler, C. (2000). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, *13*(6), 795-804.
- Pekkoh, J., Phinyo, K., Thurakit, T., Lomakool, S., Duangjan, K., Ruangrit, K., & Srinuanpan, S. (2022). Lipid profile, antioxidant and antihypertensive activity, and computational molecular docking of diatom fatty acids as ACE inhibitors. *Antioxidants*, *11*(2), 186.
- Pereira, A. M., Lisboa, C. R., Santos, T. D., Vieira Costa, J. A. (2019) 'Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions', *Journal of Food Science and Technology*, *56*(10), pp. 4543–4551.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 2002–2007, e45.
- Pihlanto, A. (2011). Bioactive Peptides, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, *20*(1), 3-10.

- Pihlanto-Leppälä, A. N. N. E., Koskinen, P., Piilola, K. A. T. I., Tupasela, T., & KORHONEN, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325-331.
- Politis, I., & Theodorou, G. (2016). Angiotensin I-converting (ACE)-inhibitory and anti-inflammatory properties of commercially available Greek yoghurt made from bovine or ovine milk: A comparative study. *International Dairy Journal*, 58, 46-49.
- Porat, G. (2003). Initial treatment of hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 349(11), 1090-1.
- Prakash, D.R & Kumari, P. (2011). Preparation of low-fat and high-protein frozen yoghurt enriched with papaya pulp and Spirulina. *Trends Biosci* 4(2):182–4.
- Puyfoulhoux, G., Rouanet, J. M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J. C., & Caporiccio, B. (2001). Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3), 1625-1629.
- Ravi, M., De, S. L., Azharuddin, S., & D Paul, S. F. (2010). The beneficial effects of Spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and dietary supplements*, 73-83.
- Ravindran, B., Gupta, S. K., Cho, W., Jung Kon Kim, Sang Ryong Lee, Kwang-Hwa Jeong, Dong Jun Lee, & Hee-Chul Choi. (2016). 'Microalgae potential and multiple roles-current progress and future prospects-an overview', *Sustainability (Switzerland)*, 8(12), pp. 1–16.
- Rana, M. S., & Prajapati, S. K. (2021). Resolving the dilemma of iron bioavailability to microalgae for commercial sustenance. *Algal Research*, 59, 102458.
- Rani, K., Sandal, N. & Sahoo, P. K. (2018). 'A comprehensive review on chlorella-its composition, health benefits, market and regulatory scenario', *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), pp. 584–589.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
- Robertson, R. C., Mateo, M. R. G., O'Grady, M. N., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., Ross, R. P., & Stanton, C. (2016). An assessment of the techno-functional and sensory properties of yoghurt fortified with a lipid extract from the microalga *Pavlova lutheri*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 237-246.
- Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J.L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry* 108: 1023–1026.
- Romay, C. R. González, N., Ledón, D., Remire D., & Rimbau V. (2003). 'C-Phycocyanin: A Biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective effects).pdf', *Current Protein and Peptide Science*, 4, pp. 207–216.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C. (2014). 'Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp. 265–278.

- Sanchez, M., Castillo, B.J., Rozo, C., Rodriguez, I., (2003). Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism a review.
- Sangsawad, P., Katemala, S., Pao, D., Suwanangul, S., Jeecham, R., & Sutheerawattananonda, M. (2022). Integrated Evaluation of Dual-Functional DPP-IV and ACE Inhibitory Effects of Peptides Derived from Sericin Hydrolysis and Their Stabilities during In Vitro-Simulated Gastrointestinal and Plasmin Digestions. *Foods*, *11*(23), 3931.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Mata-Haro, V., & González-Córdova, A. F. (2016). Food-derived immunomodulatory peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(11), 3631-3641.
- Saranraj P. & Sivasakthi S. (2015). Spirulina platensis - Food for Future– A REVIEW ‘Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology PHARMACOVIGILANCE, *5*(4), pp. 92-94.
- Sasson, A. (1997). Micro Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. BIOTEC Publication 1/2542. pp. 11–31. Place de Fontenoy, Paris. France. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO).
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A. & Nakano T., (2002). Angiotensin I-converting- enzyme-inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6245-6252.
- Schmid, K., Schlothauer, R. C., Friedrich, U., Staudt, C., Apajalahti, J., & Hansen, E. B. (2006). Development of probiotic food ingredients. *Probiotics in food safety and human health*, 35-66.
- Schopf, J.W., (2002). The fossil record: Tracing the roots of the Cyanobacterial lineage in: “The Ecology of Cyanobacteria”, Whitton, B.A. and Potts, M. eds Kluwer Academic Publ. New York.
- Scrimshaw, N. S., SanGiovanni, J. P. (1997). Synergism of nutrition, infection, and immunity: An overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, *66*, 464S-477S.
- Sedighi, M., Jalilib, H., Darvishb, M., Sadeghib, S., Ranaei-Siadatc, S.O. (2019). ‘Enzymatic hydrolysis of microalgae proteins using serine proteases: A study to characterize kinetic parameters’, *Food Chemistry*, *284*(April 2018), pp. 334–339.
- Sedighi, M., Jalili, H., Ranaei-Siadatc, S.O., Amrane, A. (2016). Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*. *Applied Food Biotechnology*, *3* (3):160-169.
- Seidman, A. L. (2010). Εργαστηριακοί υπολογισμοί στις βιολογικές επιστήμες. Αλεξανδρούπολη. Εκδόσεις Ι. Μπασδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. Κεφ. 24.
- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and innovative processing of milk for yoghurt manufacture; development of texture and flavor: a review. *Foods*, *3*(1), 176-193.
- Shah, N. P. (2013). Health benefits of yoghurt and fermented milks. *Manufacturing yoghurt and fermented milks*, 433-450.

- Shalaby, S. M., Zakora, M., & Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73(2), 178-186.
- Sharma, R., Singh, G.P., Sharma, V.K. (2012). Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 3: 1–6.
- ¹Sheih, I. C., Fang, T. J. & Wu, T. K. (2009). 'Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste', *Food Chemistry*, 115(1), pp. 279–284.
- ²Sheih, I. C., Wu, T. K. & Fang, T. J. (2009). 'Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems', *Bioresource Technology*, 100(13), pp. 3419–3425.
- Sheih, I. C., Fang, T. J., Wu, T. K., Lin, P. H. (2010). 'Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp. 1202–1207.
- Shokri, H., Khosravi, A. R., & Taghavi, M. (2014). Efficacy of *Spirulina platensis* on immune functions in cancer mice with systemic candidiasis. *Journal of Mycology Research*, 1(1), 7-13.
- Sibi, G., & Rabina, S. (2016). Inhibition of pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. *Pharmacognosy research*, 8(2), 118.
- Singh, R.N. & Sharma, S., (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production – A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 16, Pages 2347-2353.
- Soni, R. A., Sudhakar, K. & Rana, R. S. (2017). 'Spirulina – From growth to nutritional product: A review', *Trends in Food Science and Technology*, 69, pp. 157–171.
- Spahn, T. W., & Kucharzik, T. (2004). Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*, 53(3), 456-465.
- Spolaore, P., Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, Arsène Isambert. (2006). Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 101, Issue 2, Pages 87-96.
- Srirangan S., & Choy EH. (2010.) The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*; 2(5): 247-256.
- Suetsuna, K. & Chen, J.R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 3(4), 305–309.
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S., & Shahid, M. (2017). Antihypertensive and antioxidative potential of water soluble peptide fraction from different yoghurts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12979.
- Sun, Y., Chang, R., Li, Q., & Li, B. (2016). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 242(5), 685–692.

Suzery, M., Sutanto, H., & Widiastuti, Y. (2018). Improvement the Yoghurt Nutritional Value, Organoleptic Properties and Preferences by Spirulina (*Spirulina platensis*) Supplementation. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 349, No. 1, p. 012040). IOP Publishing.

Tadros, M.G. (1988). Characterization of Spirulina biomass for CELLS diet potential. NASA Contractor NCC 2-501.

Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., & Hassan, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Science and Biotechnology*, 26(5), 1325-1332.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., & Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4), 443-451.

Templeton, G. F. (2011). A two-step approach for transforming continuous variables to normal: implications and recommendations for IS research. *Communications of the association for information systems*, 28(1), 4.

Theodorou, G., & Politis, I. (2016). Effects of peptides derived from traditional Greek yoghurt on expression of pro-and anti-inflammatory genes by ovine monocytes and neutrophils. *Food and Agricultural Immunology*, 27(4), 484-495.

Tian T, Wang M, Ma D. (2014). TNF-alpha, a good or bad factor in hematological diseases? Stem cell investigation; 1: 12.

Tomovska, J., Presilski, S., Gjorgievski, N., Tomovska, N., Qureshi, M. S., & Bozinovska, N. P. (2013). Development of a spectrophotometric method for monitoring angiotensin-converting enzyme in dairy products. *Pak Vet J*, 33(1), 14-18.

Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnol. Adv.* 41, 107536.

Udenigwe, C.C. & Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71, R11-R24.

Ugwu, C.U., H. Aoyagi, & H. Uchiyama. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology*, Volume 99, Pages 4021-4028.

Underwood, A. (2005). The new superfoods. *Newsweek*, 146(17), 7980.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T. (2012). "Primer3—new capabilities and interfaces," *Nucleic Acids Res.* vol. 40, no. 15, e115.

Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Lhoutellier, V. S., Djelveh, G., Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*, Volume 157, Pages 134-139.

Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications, *Bioresource Technology*, Volume 105, Pages 114-119.

Verspreet, J., Soetemans, L., Gargan, C., Hayes, M., Bastiaens, L. (2021). Nutritional Profiling and preliminary bioactivity screening of five micro-algae strains cultivated in Northwest Europe. *Foods*, 10, 1516.

Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 81-92.

Viollier, E., P.W. Inglett K. Hunter, A.N. Roychoudhury, P. Van Cappellen. (2000) 'The Ferrozine method revisited', *Applied Geochemistry*, 15, pp. 785–790.

¹Vo, T.S., Ryu, B., Kim, S. K. (2013). Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *Journal of Functional Foods*, Volume 5, Issue 3, Pages 1336-1346.

²Vo, T.-S. & Kim, S.-K. (2013). Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*. *Eur. J. Pharm*, 50(2), 198–207.

Vo, T.-S., Ngo, D.-H., Kang, K.-H., Park, S.-J., Kim, S.-K. (2014). The role of peptides derived from *Spirulina maxima* in downregulation of FcεRI-mediated allergic responses. *Mol. Nutr. Food*, 58(11), 2226–2234.

Vonshak, A. & Tomaselli, L. (2000) *Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology*. In: "The Ecology of Cyanobacteria" Whiton, B.A. and Potts, M. eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, pp. 505-522.

Vree, J.H., Bosma, R., Janssen, M. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnol Biofuels* 8, 215.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*; 10(1): 45-65.

Wajant, H., & Scheurich, P. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33(1), 19-32.

Wang, Z. & Zhang, X. (2017). Isolation and identification of anti-proliferative peptides from *Spirulina platensis* using three-step hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 918-922.

Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S. & Miyamao, E. (2002) Characterization and Bioavailability of vitamin B₁₂-Compounds from Edible Algae. *Nutr. Sci. Vitamol.*, 48(5), 325-331.

Widyaningrum, D. & Prianto, A. D. (2021). 'Chlorella as a Source of Functional Food Ingredients: Short review', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 794(1).

Wolfe D. (2009). *Superfoods: The food and medicine of the future*. California: North Atlantic Books.

- Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure– activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(3), 732-738.
- Wu, J., Liao, W., & Udenigwe, C. C. (2017). Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 214-219.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of toxicology*, *90*, 1817-1840.
- Yadav, A., Saini, V., & Arora, S. (2010). MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clinica chimica acta*, *411*(21-22), 1570-1579.
- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of plant research*, *117*, 257-264.
- Yamamoto, N., Maeno, M., & Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yoghurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, *82*(7), 1388-1393.
- Yang, S., Wang, J., Brand, D. D., & Zheng, S. G. (2018). Role of TNF–TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. *Frontiers in immunology*, *9*, 784.
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Bioresource Technology*, Volume 105, Pages 120-127.
- Ye, H., Tao, X., Zhang, W., Chen, Y., Yu, Q., Xie J. (2022). ‘Food-derived bioactive peptides: production, biological activities, opportunities and challenges’, *Journal of Future Foods*, *2*(4), pp. 294–306.
- Ye, S., Chen, Q., Li, D., Zhou, H., Chen, Y., Meng, C., & Hong, J. (2022). Isolation and identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pony Seed and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Journal of Functional Foods*, *95*, 105151.
- Yoon, Y. K., Woo, H. J. & Kim, Y. (2015). ‘*Orostachys japonicus* inhibits expression of the TLR4, NOD2, iNOS, and COX-2 genes in LPS-stimulated human PMA-differentiated THP-1 cells by inhibiting NF- B and MAPK activation’, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 1–10.
- Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC cancer*, *14*(1), 1-12.
- Yücepepe, A., Kasapoğlu, K. N., & Özçelik, B. (2018). Angiotensin-i-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of tryptic *Spirulina platensis* protein hydrolysates: effect of hydrolysis and in vitro gastrointestinal digestion. *Ecological Life Sciences*, *13*(3), 151-162.
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews cancer*, *9*(11), 798-809.
- Yu, X., Buttgereit, A., Lelios, I., Utz, S. G., Cansever, D., Becher, B., & Greter, M. (2017). The cytokine TGF-β promotes the development and homeostasis of alveolar macrophages. *Immunity*, *47*(5), 903-912.

Zeisel S.H. (1999). Regulation of 'nutraceuticals', *Science*, 285, 1853-1855.

Zeng, Q., Wang, J. J., Zhang, Y., Song, Y., Liang, J., & Zhang, X. (2020). Recovery and identification bioactive peptides from protein isolate of *Spirulina platensis* and their in vitro effectiveness against oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(9), 3776–3782.

Zhang, N., Li, F., Zhang, T., Li, C. Y., Zhu, L., & Yan, S. (2022). Isolation, identification, and molecular docking analysis of novel ACE inhibitory peptides from *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 248(4), 1107-1115.

Zheng, J. Wang J., Pan, H., Wu, H., Ren, R., Lu, J. (2017). 'Effects of IQP, VEP and *Spirulina platensis* hydrolysates on the local kidney renin angiotensin system in spontaneously hypertensive rats', *Molecular Medicine Reports*, 16(6), pp. 8485–8492.

Ιστότοποι

ΑΛΓΗ Α.Ε.Γ.Ε. (2020). *The Greek Spirulina*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.spirulina.gr/> [ανάκτηση 06/10/2022].

Fresh Spirulina Australia. (2021). *Spirulina under the microscope*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.freshspirulina.com.au/spirulina/spirulina-under-the-microscope/> [ανάκτηση 13/11/2022].

Kovai Agro Farms. (2020). *Spirulina introduction*. [online]. Διαθέσιμο στο: <http://www.kovaiagrofarm.in/spirulina-introduction/> [ανάκτηση 13/11/2022].

Tere Group. (2016). *Chlorella vulgaris*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.teregroup.it/en/chlorella/> [ανάκτηση 20/12/2022].

Desertat. (2023). *Gizmo Supply Professional Neubauer Hemocytometer Blood Count with Double Counting Chamber*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.desertcart.gr/products/21783832> [ανάκτηση 6/02/2023].

Merck. (2023). *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit*. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/mm/ufc8050> [ανάκτηση 13/02/2023].

Takara. (2008). *PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)- User Manual*. [online]. Διαθέσιμο στο: https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/RR037A_e.v2008Da.pdf [ανάκτηση 14/02/2023].

Wikimedia commons (2023). *File: 96- well plate.svg*. [online]. Διαθέσιμο στο: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg [ανάκτηση 17/02/2023].