

Οργανισμός  
Βιομηχανικής  
Ιδιοκτησίας (ΟΒΙ)



(21) Αριθμός αίτησης:

GR 20230100374

(12)

## ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (B)

(47) Ημ/νία Δημοσίωσης: 25.07.2024

(51) Διεθνής Ταξινόμηση (Int. Cl.):

(11) Αριθμός Χορήγησης: 1010731

C12N 1/12 (2024.01)

A01G 33/00 (2024.01)

(22) Ημ/νία Κατάθεσης: 09.05.2023

C12N 1/00 (2024.01)

(45) Ημ/νία Δημοσίευσης της Χορήγησης:  
19.08.2024 ΕΔΒΙ 7/2024

(73) Δικαιούχος (οι):

(71) Αρχικός (οί) Καταθέτης (ες):

ΛΑΜΑΡΗ ΦΩΤΕΙΝΗ ΝΙΚΟΛΑΟΥ; Κοιμήσεως Θεοτόκου (Περιοχή Καστελόκαμπου) 37, 26442 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ ΣΟΦΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ-ΕΥΓΕΝΙΟΥ; Λουδία 1, 26442 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΑΝΔΡΙΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ; Ζήνωνος 10, 19009 ΡΑΦΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) - GR. ΓΚΙΩΝΗ ΜΑΡΙΑ ΔΑΜΙΑΝΟΥ; Μπουρνόβα 19, 14232 ΝΕΑ ΙΩΝΙΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) - GR. ΚΟΡΝΑΡΟΣ ΜΙΧΑΗΛ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ; Λευκωσίας 21, 26441 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ / Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας; Πανεπιστημιούπολη, Ρίο Πατρών, 26504 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ-ΕΙΔΙΚΟΣ ΛΟΓΑΡΙΑΣΜΟΣ ΚΟΝΔΥΛΙΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ; Πανεπιστημιούπολη Ρίου Πατρών, 26504 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΛΑΜΑΡΗ ΦΩΤΕΙΝΗ ΝΙΚΟΛΑΟΥ; Κοιμήσεως Θεοτόκου (Περιοχή Καστελόκαμπου) 37, 26442 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ ΣΟΦΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ-ΕΥΓΕΝΙΟΥ; Λουδία 1, 26442 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR. ΑΝΔΡΙΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ; Ζήνωνος 10, 19009 ΡΑΦΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) - GR. ΓΚΙΩΝΗ ΜΑΡΙΑ ΔΑΜΙΑΝΟΥ; Μπουρνόβα 19, 14232 ΝΕΑ ΙΩΝΙΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) - GR. ΚΟΡΝΑΡΟΣ ΜΙΧΑΗΛ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ; Λευκωσίας 21, 26441 ΠΑΤΡΑ (ΑΧΑΪΑΣ) - GR.

(72) Εφευρέτης (ες):

ΚΟΡΝΑΡΟΣ ΜΙΧΑΗΛ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ; , GR. ΑΝΔΡΙΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ; , GR. ΛΑΜΑΡΗ ΦΩΤΕΙΝΗ ΝΙΚΟΛΑΟΥ; , GR. ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ ΣΟΦΙΑ-ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ-ΕΥΓΕΝΙΟΥ; , GR. ΓΚΙΩΝΗ ΜΑΡΙΑ ΔΑΜΙΑΝΟΥ; , GR.

(74) Πληρεξούσιος:

ΑΡΓΥΡΙΑΔΗ ΔΙΚΗΓΟΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΡΓΥΡΙΑΔΗ ΚΟΡΙΝΝΑ; Βησσαρίωνος 6, 10672 ΑΘΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ).

(54) Τίτλος (Ελληνικά)

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ

(54) Τίτλος (Αγγλικά)

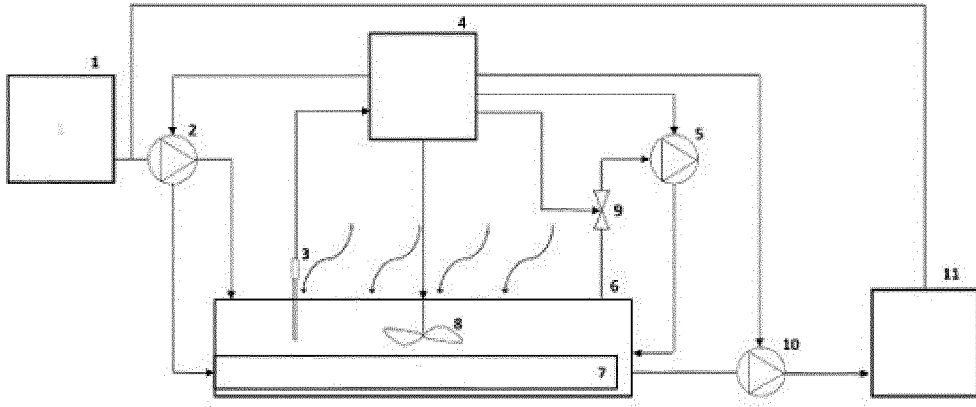
CULTIVATION OF MICROALGAE FOR THE PRODUCTION OF EXTRACT AND BIOMASS OF HIGH NUTRITIONAL VALUE

(57) Περίληψη

Περιγράφεται μια μέθοδος για την καλλιέργεια μικροφυκών των γενών /sochrysis, Nannochloopsis και Tisochoyisis που περιλαμβάνει τα εξής στάδια 1) αυτότροφη ανάπτυξη του/των μικροφύκους/κών για την παραγωγή βιομάζας με παροχή αέρα με ή χωρίς εμπλουτισμό με διοξείδιο του άνθρακα, και 2) επιλεκτική διακοπή του αερισμού με παράλληλο φωτισμό και ανάμιξη για περιορισμένο χρονικό διάστημα με σκοπό την επαγωγή παραγωγής αντιοξειδωτικών ουσιών, καθώς και χειρισμό της βιομάζας των μικροφυκών που προκύπτουν από την καλλιέργεια, ο οποίος περιλαμβάνει: α) συγκομιδή της βιομάζας με φυγοκέντριση, καθίζηση, κροκίδωση, φιλτράρισμα ή συνδυασμούς τους, β) πλύση της βιομάζας με κατάλληλο διάλυμα εάν αυτό είναι απαραίτητο, γ) ξήρανση της βιομάζας με λυοφιλίωση και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης, δ) εκχύλιση της νωπής ή λυοφιλιωμένης βιομάζας, ε) ξήρανση του εκχυλίσματος βιομάζας και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης στ) ξήρανση της εκχυλισμένης βιομάζας και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης. Τα παραγόμενα προϊόντα έχουν χρήσεις ως συμπλήρωμα διατροφής, ως σιτηρέσιο ζωοπαραγωγής ή ιχθυοπαραγωγής, ή για την παρασκευή καλλυντικών ή άλλων σκευασμάτων ανθρώπινης χρήσης.

GR 20230100374 GR 1010731

GR20230100374 GR1010731



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΑΖΑΣ  
ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ**

5

Περιγράφεται μια μέθοδος για την καλλιέργεια μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis* που περιλαμβάνει τα εξής στάδια 1) αυτότροφη ανάπτυξη του/των μικροφύκους/κών για την παραγωγή βιομάζας με παροχή αέρα με ή χωρίς εμπλουτισμό με διοξείδιο του άνθρακα, και 2) επιλεκτική διακοπή του αερισμού με παράλληλο φωτισμό και ανάμιξη για περιορισμένο χρονικό διάστημα με σκοπό την επαγωγή παραγωγής αντιοξειδωτικών ουσιών, καθώς και χειρισμό της βιομάζας των μικροφυκών που προκύπτουν από την καλλιέργεια, ο οποίος περιλαμβάνει:

10

- συγκομιδή της βιομάζας με φυγοκέντριση, καθίζηση, κροκίδωση, φιλτράρισμα ή συνδυασμούς τους
- πλύση της βιομάζας με κατάλληλο διάλυμα εάν αυτό είναι απαραίτητο
- ξήρανση της βιομάζας με λυοφιλίωση και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης
- εκχύλιση της νωπής ή λυοφιλιωποιημένης βιομάζας
- ξήρανση του εκχυλίσματος βιομάζας και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης
- ξήρανση της εκχυλισμένης βιομάζας και παραγωγή της αντίστοιχης σκόνης

15

20

Τα παραγόμενα προϊόντα έχουν χρήσεις ως συμπλήρωμα διατροφής, ως σιτηρέσιο ζωοπαραγωγής ή ιχθυοπαραγωγής, ή για την παρασκευή καλλυντικών ή άλλων σκευασμάτων ανθρώπινης χρήσης.

25

30

35

## ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

5

#### ΠΕΔΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ

Η παρούσα ευρεσιτεχνία αναφέρεται στην καλλιέργεια θαλάσσιων μικροφυκών σε συνθετικό μέσο με ατμοσφαιρικό αέρα, την εκχύλιση της βιομάζας με 2 μεθόδους για παραγωγή εκχυλίσματος πλούσιου σε χρωστικές και άλλες βιοδραστικές ουσίες και ανάκτηση βιομάζας πλούσιας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες, και τέλος την προετοιμασία επιδερμικού σκευάσματος με αντιηλιακές ή/και ενυδατικές ιδιότητες από το εκχύλισμα.

#### ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ

Η καλλιέργεια μικροφυκών σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται κυρίως με δύο τρόπους: αυτότροφες συνθήκες με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα ή αέρα εμπλουτισμένου σε διοξείδιο του άνθρακα και φυσικό ή τεχνητό φωτισμό, ή σε ετερότροφες συνθήκες με παροχή οξυγόνου και οργανικού άνθρακα (Posten and Chen n.d.). Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθεί ξήρανση της βιομάζας, μια διαδικασία που αυξάνει σημαντικά το λειτουργικό κόστος της διεργασίας (Chen, Chang, and Lee 2015). Η ξηρή βιομάζα μπορεί είτε να διατεθεί στην αγορά σαν συμπλήρωμα διατροφής ή να ακολουθήσει απομόνωση των επιμέρους συστατικών του κυττάρου, κυρίως των λιπαρών και των χρωστικών προς περαιτέρω αξιοποίηση (Ruiz et al. 2016). Σε μερικές περιπτώσεις ειδών με ανθεκτικό κυτταρικό τοίχωμα απαιτείται διάρρηξη του για εκχύλιση των επιμέρους συστατικών, κάτι που επίσης αυξάνει το λειτουργικό κόστος και απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό (Yoo et al. 2013). Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η εκχύλιση της βιομάζας με τρόπο που να μην απομακρύνει όλα τα λιπαρά για συμπαραγωγή εκχυλίσματος πλούσιου σε βιοδραστικές ουσίες και υπολειπόμενης βιομάζας αυξημένης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ή/και υδατάνθρακες καθώς και πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Gkioni et al. 2022). Συγκεκριμένα έχει προταθεί η εκμετάλλευση της υπολειπόμενης βιομάζας ως σιτηρέσιο ιχθυοκαλλιέργειών για μερική αντικατάσταση των ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιων που χρησιμοποιούνται στο παρόν, με μεγάλο αντίκτυπο στο θαλάσσιο περιβάλλον, καθώς επίσης και η χρήση της ως χορτοφαγικό συμπλήρωμα διατροφής υψηλής αξίας (Andriopoulos, Gkioni, et al. 2022; Nicoletti 2016; Schade and Meier 2021). Εκτός από τις πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα, άλλες ενώσεις υψηλής αξίας που περιέχονται τόσο στο εκχύλισμα όσο και στην υπολειπόμενη βιομάζα είναι τα καροτενοειδή, τα οποία έχουν

αντηλιακή και αντιοξειδωτική δράση, ενώ επίσης είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ιχθύων, χλωροφύλλες που έχουν αντιοξειδωτικές και βιοδραστικές ιδιότητες, καθώς και άλλα μόρια όπως β-γλυκάνες, που έχουν ανοσορυθμιστική δράση, φαινολικές ενώσεις, ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση κ.ά (Barkia, Saari, and Manning 2019; Koutra et al. 5 2022).

Στην παρούσα ευρεσιτεχνία προτείνεται η καλλιέργεια θαλάσσιων ειδών μικροφυκών τριών γενών, των *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis*. Τα γένη *Isochrysis* και *Tisochrysis* ανήκουν στον κλάδο των Απτόφυτων και είναι συγγενικά, καθώς το τελευταίο περιλαμβάνει ένα μόνο είδος, το *Tisochrysis lutea*, το οποίο μέχρι πρότινος ήταν ταξινομημένο σαν 10 στέλεχος του *Isochrysis galbana* (Méndez-Leyva et al. 2019). Τα μικροφύκη αυτών των γενών καλλιεργούνται σε μονάδες ιχθυοτροφής και οστρακοπαραγωγής για την διατροφή των γόνων (Zhu et al. 2019). Φέρουν μαστίγιο, δεν φέρουν κυτταρικό τοίχωμα, μπορεί να καλύπτονται όμως από κοκκολιθικά φολίδια (Wikfors and Patterson 1994). Έχουν υψηλή 15 περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, καροτενοειδή και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, κυρίως δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) που μπορεί να φτάσει μέχρι και ~3% του ξηρού βάρους της βιομάζας (Huang et al. 2017). Το *T. lutea* μπορεί να συσσωρεύσει το βιοδραστικό καροτενοειδές φουκοξανθίνη, ενώ είδη του γένους *Isochrysis* μπορούν να συσσωρεύσουν βιοδραστικούς πολυσακχαρίτες, όπως η χρυσολαμιναρίνη (Gonçalves de Oliveira-Júnior et al. 2020). Άλλες ενώσεις υψηλής αξίας που μπορεί να περιέχονται σε αυτά τα είδη 20 περιλαμβάνουν φαινολικές ουσίες, φλαβονοειδή και συνένζυμα, ενώ τα εκχυλίσματά τους παρουσιάζουν διάφορες βιοδραστικές ιδιότητες όπως αντικαρκινική δράση, δράση μείωσης της χοληστερόλης κ.α. (Andriopoulos, Gkioni, et al. 2022; Goiris et al. 2012). Το γένος *Nannochloropsis* ανήκει στην τάξη των Ευστιγματοφυκών και περιλαμβάνει τέσσερα θαλάσσια είδη και ένα είδος του γλυκού νερού (Zanella and Vianello 2020). Είδη αυτού του 25 γένους έχουν προταθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων, καθώς μπορούν να συσσωρεύσουν λιπαρά, κυρίως μη πολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα, σε ποσοστό μέχρι ~ 50 % του ξηρού βάρους, ενώ παράλληλα είναι ανθεκτικά σε μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και κατάλληλα για καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (Mehra and Jutur 2022). Τα τελευταία χρόνια, παρόλα αυτά, το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στην παραγωγή πιο υψηλής 30 αξίας προϊόντων, όπως πρωτεΐνη υψηλής αξίας, ωμέγα-3 λιπαρά και χρωστικές (Andriopoulos, Lamari, et al. 2022; Gkioni et al. 2022; Meng et al. 2015). Τα είδη αυτά μπορούν να περιέχουν πρωτεΐνη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% του ξηρού τους βάρους, εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) σε ποσοστό ~ 5 % του ξηρού βάρους, ενώ κύριες χρωστικές είναι η χλωροφύλλη α και η βιολαξανθίνη (Andriopoulos, Lamari, et al. 2022; Gkioni et al.

2022). Είδη του γένους περιέχουν επίσης βιοδραστικούς πολυσακχαρίτες με ανοσορυθμιστική δράση, τις β-γλυκάνες (Rojo-Cebreros et al. 2017).

#### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ

- 5 Στο Σχ.1 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα της διάταξης για την καλλιέργεια των προτεινόμενων ειδών, καθώς και την αρχική συλλογή νωπής βιομάζας. Τα στοιχεία που περιλαμβάνονται είναι: (1) δεξαμενή/ες με υπόστρωμα καλλιέργειας, ρυθμιστικό διάλυμα (υποστρώματα όπως το αμμωνιακό ή οργανικός άνθρακας μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο του pH ή του διαλυμένου οξυγόνου αντίστοιχα), ή/και ψυκτικό ή
- 10 θερμαντικό υγρό, (2) αντλία/ες, (3) αισθητήρας/ες θερμοκρασίας, pH, διαλυμένου οξυγόνου ή διοξειδίου του άνθρακα, οπτικής πυκνότητας, ιοντικής ισχύος, σπεκτροσκοπίας Raman ή κάποιος συνδυασμός τους, (4) κεντρική/ες μονάδα/ες ελέγχου που δέχεται τα σήματα των αισθητήρων (3) και ελέγχει κάποιες ή όλες τις αντλίες ή/και βαλβίδες και επικοινωνεί με υπολογιστές για την ζωντανή καταγραφή δεδομένων και παρακολούθηση/ελέγχου της
- 15 διεργασίας, (5) αντλία/ες αέρα που μπορεί να δέχεται ατμοσφαιρικό αέρα ή/και επιπλέον παροχές αερίου, (6) σύστημα καλλιέργειας που μπορεί να περιλαμβάνει κυλινδρικούς αντιδραστήρες, αντιδραστήρες επίπεδου πάνελ ή κάποιο άλλο κλειστό σύστημα καλλιέργειας που δέχονται φυσικό ή/και τεχνητό φωτισμό (καμπυλωτά βέλη), (7) θερμοανταλλάκτης που τροφοδοτείται από κάποια αντλία (1), (8) μηχανισμός ανάδευσης
- 20 πέραν το αερισμού που μπορεί να ελέγχεται από κεντρική μονάδα (4), (9) βαλβίδα/ες που επιτρέπει είτε την έξοδο του αέρα από το σύστημα είτε την ανακυκλοφορία του είτε κάποιο συνδυασμό των δύο, (10) αντλία/ες για την απομάκρυνση μέσου καλλιέργειας και βιομάζας, (11) σύστημα αρχικής απομάκρυνσης νερού από τη βιομάζα που μπορεί να περιλαμβάνει φυγόκεντρο, δεξαμενή καθίζησης, δεξαμενή κροκιδώσης, φίλτρα ή κάποιο συνδυασμό
- 25 τους, ενώ το διαχωριζόμενο υγρό μέσο καλλιέργειας μπορεί να απορρίπτεται ή/και να επανεισάγεται στο σύστημα με κάποια αντλία (1). Η νωπή βιομάζα που προκύπτει μπορεί να πλυθεί με κατάλληλο διάλυμα και να οδηγηθεί είτε προς ξήρανση με λυοφιλίωση (αφού προηγηθεί κατάψυξη) είτε να χρησιμοποιηθεί ως έχει. Η βιομάζα (ξηρή ή νωπή) μπορεί ακολούθως να εκχυλιστεί με κατάλληλο διαλύτη και με την υποβοήθηση ή όχι υπέρηχων.
- 30 Το εκχύλισμα μπορεί ακολούθως είτε να ξηρανθεί και να χρησιμοποιηθεί σαν σκόνη για την προετοιμασία κάποιου σκευάσματος είτε να χρησιμοποιηθεί ως έχει. Η υπολειπόμενη βιομάζα από την εκχύλιση μπορεί είτε να καταψυχθεί και να ξηρανθεί με λυοφιλίωση είτε να χρησιμοποιηθεί ως έχει. Η βιομάζα (ξηρή ή νωπή) μπορεί είτε να διατεθεί σαν συμπλήρωμα ή σιτηρέσιο, είτε να αποτελέσει συστατικό κάποιου προϊόντος.
- 35 Παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα σε εργαστηριακή κλίμακα:

**ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ I**

*Nannochloropsis oculata* καλλιεργήθηκε σε τέσσερις φορές συμπυκνωμένο θρεπτικό μέσο f/2 χωρίς βιταμίνες σε κλειστό σύστημα αποτελούμενο από γυάλινες φιάλες με αισθητήρες θερμοκρασίας και pH και έλεγχο τους από κεντρική μονάδα με κυκλοφορία νερού σε 5 θερμοανταλλάκτη και προσθήκη υδροχλωρικού οξέος αντίστοιχα. Το σύστημα είχε παροχή ατμοσφαιρικού αέρα και συνεχή χαμηλό τεχνητό φωτισμό LED (~ 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  στην επιφάνεια με οπτικό μονοπάτι 15 cm), ενώ παράλληλα παρεχόταν επιπλέον ανάμιξη της καλλιέργειας με αναδευτήρα. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε στο 8 με σκοπό τη 10 δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα με την μορφή ανθρακικού αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα άνθρακα σε σχέση με τον ατμοσφαιρικό αέρα, ενώ η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 20 °C, που είναι ιδανική για την ομαλή ανάπτυξη αυτού του μικροοργανισμού. Η βιομάζα συλλέχθηκε με φυγοκέντριση στην αρχή της εξάντλησης του νιτρικού, που ήταν η πηγή αζώτου, πλύθηκε με ισοτονικό διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου, καταψύχθηκε και λυοφιλιώθηκε. Ακολούθησε εκχύλιση με απόλυτη αιθανόλη σε 15 θερμοκρασία δωματίου με αναλογία βιομάζας/αιθανόλης 5 (mg/mL) και υποβοήθηση από υπέρηχους. Το εκχύλισμα που ελήφθη ήταν πλούσιο σε χρωστικές (χλωροφύλλη α, βιολαξανθίνη, ανθεραξανθίνη, β-καροτένιο) και περιείχε επίσης μεγάλο μέρος των λιπαρών οξέων της αρχικής βιομάζας. Η υπολειπόμενη βιομάζα παρόλα αυτά, είχε υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης από την αρχική βιομάζας (54 % επί του ξηρού βάρους έναντι 44 %) 20 ενώ επίσης είχε σημαντική περιεκτικότητα σε EPA (0.6 % επί του ξηρού βάρους). Συγκριτικά η αρχική βιομάζα περιείχε 3 % επί του ξηρού βάρους EPA. Επίσης η υπολειπόμενη βιομάζα περιείχε 0.2 % επί του ξηρού βάρους σε καροτενοειδή έναντι 1.27 % στην αρχική βιομάζα. Η υπολειπόμενη βιομάζα είχε πρακτικά μηδαμινό ποσοστό υγρασίας και όταν απομακρύνθηκε η αιθανόλη με λυοφιλίωση απέκτησε μορφή πούδρας 25 που ήταν εξαιρετικά εύκολη στον χειρισμό, κάτι σημαντικό για την καταλληλότητά της προς βιομηχανική χρήση. στην συνέχεια Το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή επιδερμική αλοιφής που σε δοκιμές με εθελοντές επέδειξε ενυδατικές ιδιότητες.

**ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ II**

30 *Nannochloropsis oculata* καλλιεργήθηκε όπως στο παράδειγμα 1 αλλά σε θερμοκρασία 27.5 °C. Η βιομάζα αυξήθηκε 4 φορές σε 5 μέρες και έγινε συγκομιδή πριν την εξάντληση του νιτρικού αζώτου, συλλέχθηκε με φυγοκέντριση, πλύθηκε με ισοτονικό διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου, καταψύχθηκε και λυοφιλιώθηκε. Ακολούθησε εκχύλιση με απόλυτη αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου με αναλογία βιομάζας/αιθανόλης 20 (mg/mL) και 35 υποβοήθηση από υπέρηχους. Το εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε χρωστικές ενώ η

υπολειπόμενη βιομάζα είχε υψηλή σύσταση πρωτεϊνών (~51 % επί του ξηρού βάρους), ~ 2.5 % επί του ξηρού βάρους EPA και ~ 1.6 % επί του ξηρού βάρους καροτενοειδή.

### ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ III

5 *Tisochrysis lutea* καλλιεργήθηκε σε κωνικές φιάλες με υψηλό φωτισμό (επιφανειακά ~ 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  σε οπτικό μονοπάτι 7 cm) και αερισμό με ατμοσφαιρικό αέρα στους 25 °C, σε τέσσερις φορές συμπυκνωμένο θρεπτικό μέσο f/2 με βιταμίνες για 10 ημέρες φτάνοντας συγκέντρωση ξηρής βιομάζας ~ 1 g L<sup>-1</sup>. Η βιομάζα συλλέχθηκε, πλύθηκε και ξηράνθηκε όπως στα Παραδείγματα 1 και 2 και ακολούθησε διαδοχική εκχύλιση υπό ανάδευση με νερό τους 90 °C και μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου. Το υδατικό εκχύλισμα παρουσίασε κορυφές σε HPLC UV που αντιστοιχούν σε αρωματικές ενώσεις, πιθανώς φαινολικά, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε φουκοξανθίνη, ένα καροτενοειδές που βρίσκεται σε στάδιο κλινικών δοκιμών για τον καρκίνο. Η βιομάζα ήταν εξαιρετικής θρεπτικής αξίας, περιέχοντας ~ 43 % επί του ξηρού βάρους πρωτεΐνη, ~ 3 % DHA, ~ 0.3 % EPA και 0.92 % καροτενοειδή. Τα εκχυλίσματα ξηράνθηκαν, συνδυάστηκαν και έγινε αξιολόγηση της αντηλιακής προστασίας (SPF) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Επιτεύχθηκε υψηλός δείκτης SPF ~ 30 σε συγκέντρωση 6%, που σημαίνει ότι το εκχύλισμα είναι πολύ υποσχόμενο για χρήση σε επιδερμικά σκευάσματα.

20

### ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ IV

*Nannochloropsis oculata* καλλιεργήθηκε σε κωνικές φιάλες σε ήπιες συνθήκες για την παραγωγή βιομάζας σε συνθήκες ανάλογες με των Παραδειγμάτων 1 και 2. Στην συνέχεια ο αερισμός διακόπηκε με σκοπό την συσσώρευση οξυγόνου μέσω της φωτοσύνθεσης και μελέτη της επίδρασης αυτής της στρεσογόνου συνθήκης στη σύσταση του κυττάρου. Μετά από 7 ημέρες η βιομάζα συλλέχθηκε με φυγοκέντριση και εκχυλίστηκε όπως στο Παράδειγμα III. Τόσο το υδατικό όσο και το μεθανολικό εκχύλισμα παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα στην μέθοδο Folin-Ciocalteu, που συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση, ενώ το ποσοστό χρωστικών ήταν μειωμένο, που υποδεικνύει επαγωγή παραγωγής αντιοξειδωτικών μορίων σ'αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης.

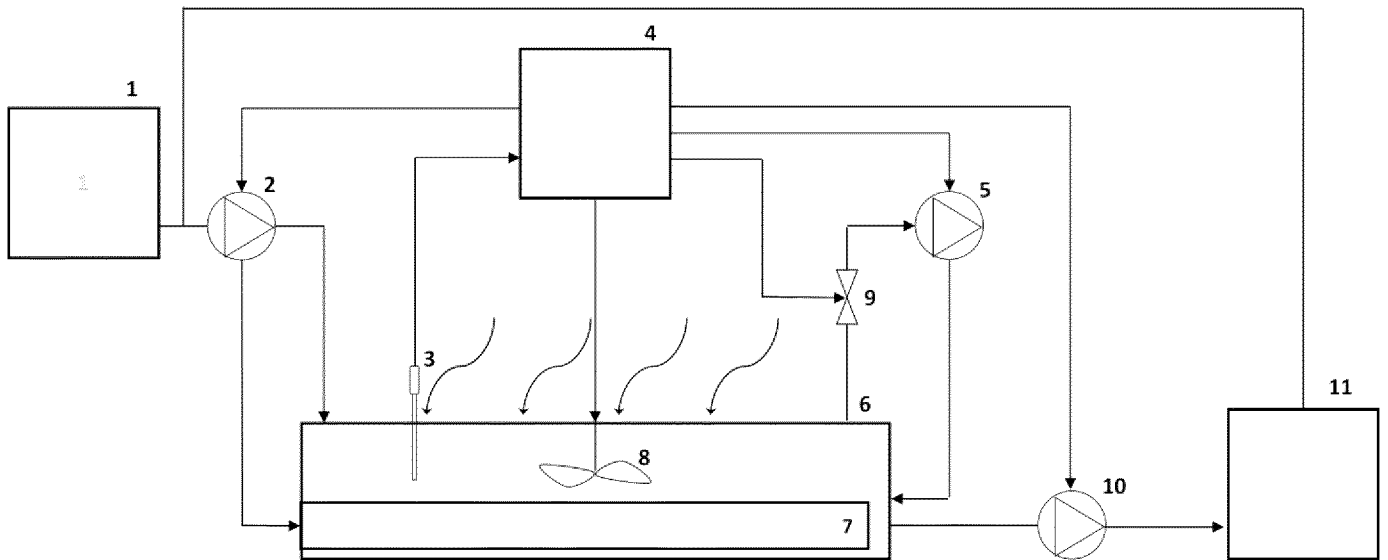
30 Η εφαρμογή της ευρεσιτεχνίας δεν περιορίζεται στα παραπάνω παραδείγματα, καθώς μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα είδη, άλλες συνθήκες καλλιέργειας και μεθόδους εκχύλισης. Διάφορες προσθήκες, τροποποιήσεις και αναδιατάξεις της παρούσας ευρεσιτεχνίας μπορούν να γίνουν χωρίς να παρεκκλίνουν από το πεδίο και τον σκοπό της αρχικής πρότασης.

35

**ΑΞΙΩΣΕΙΣ**

- Μια μέθοδος παραγωγής βιομάζας μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis* και προϊόντων αυτής, κατάλληλων για χρήση ως συμπλήρωμα διατροφής ή σιτηρέσιο ζωοπαραγωγής ή ιχθυοπαραγωγής ή για την παραγωγή καλλυντικών ή άλλων σκευασμάτων ανθρώπινης χρήσης, που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:
- αυτότροφη καλλιέργεια του/των μικροφύκους/κών για την παραγωγή βιομάζας με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα με ή χωρίς εμπλουτισμό με διοξείδιο του άνθρακα,
  - επιλεκτική διακοπή του αερισμού με παράλληλο φωτισμό και ανάμιξη για περιορισμένο χρονικό διάστημα με σκοπό την επαγωγή παραγωγής αντιοξειδωτικών ουσιών,
  - συγκομιδή της βιομάζας με φυγοκέντριση, καθίζηση, κροκίδωση, φιλτράρισμα ή συνδυασμούς τους, και
  - πλύση της βιομάζας με κατάλληλο διάλυμα (για παράδειγμα ισοτονικό διάλυμα ανθρακικού αμμωνίου), εάν αυτό είναι απαραίτητο.
- 5
- 10
- 15
2. Μια μέθοδος παραγωγής ξηρής βιομάζας μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis*, μέσω ξήρανσης της παραχθείσας βιομάζας σύμφωνα με την **αξίωση 1** με λυοφιλίωση.
3. Μια μέθοδος παραγωγής νωπών εκχυλισμάτων της βιομάζας μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis* μέσω εκχύλισης νωπής ή ξηρής βιομάζας, παραχθείσας σύμφωνα με την **αξίωση 1**, με χρήση νερού ή αιθυλικής ή μεθυλικής αλκοόλης.
- 20
4. Μια μέθοδος παραγωγής ξηρών εκχυλισμάτων της βιομάζας μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis*, μέσω εκχύλισης νωπής ή ξηρής βιομάζας, παραχθείσας σύμφωνα με την **αξίωση 1**, με χρήση νερού ή αιθυλικής ή μεθυλικής αλκοόλης και στη συνέχεια λυοφιλίωσης των εκχυλισμάτων αυτών.
- 25
5. Μια μέθοδος παραγωγής ξηρής εκχυλισμένης βιομάζας μικροφυκών των γενών *Isochrysis*, *Nannochloropsis* και *Tisochrysis*, μέσω εκχύλισης νωπής ή ξηρής βιομάζας, παραχθείσας σύμφωνα με την **αξίωση 1**, με χρήση νερού ή αιθυλικής ή μεθυλικής αλκοόλης και στη συνέχεια λυοφιλίωσης της εκχυλισμένης βιομάζας.
- 30

**Σχήμα 1**



ΕΓΓΡΑΦΑ ΘΕΩΡΟΥΜΕΝΑ ΩΣ ΣΧΕΤΙΚΑ			
Κατηγορία	Σχετικό έγγραφο με επισήμανση, όπου χρειάζεται, των σχετικών παραγράφων	Σχετικό με αξίωση	Διεθν. Ταξινόμηση Int. Cl. 01/01/2024(AL)
DA	GRXP2024054 / (ANDRIOPOULOS, V. et al.) 04.07.2022 Total Phenolic Content, Biomass Composition, and Antioxidant Activity of Selected Marine Microalgal Species with Potential as Aquaculture Feed Antioxidants 2022, 11, 1320. DOI: <a href="https://doi.org/10.3390/antiox11071320">https://doi.org/10.3390/antiox11071320</a> *Ενότητες 2.2 & 2.5* *Υποενότητα 2.4.1*	1-5	C12N 1/12 A01G 33/00 C12N 1/00
A	GRXP2024055 / (SUN, X-M. et al.) 06.11.2017 Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae Bioresource Technology Τόμος 250, 2018, Σελ. 868-876 ISSN 0960-8524, DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.005">https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.005</a> . Ανακτήθηκε από το Internet: " <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417319569">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417319569</a> " *Υποενότητα 4.1.1*	1-5	Τεχνικά πεδία που ερευνήθηκαν
A	CN104328074 A / (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST) 04.02.2015 Μηχανική μετάφραση στα Αγγλικά από EPO & Google. *Παράγραφοι [0016], [0020], [0025], [0028]* *Αξιώσεις 1-4*	1-5	C12N A01G C12R
A	EP3330365 A1 / (DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET) 06.06.2018 *Ολόκληρο το έγγραφο*	1-5	
A	CN103911289 A / (SHENYANG RES INST CHEMICAL IND) 09.07.2014 Μηχανική μετάφραση στα Αγγλικά από EPO & Google. *Ολόκληρο το έγγραφο*	1-5	
Τα αναφερόμενα έγγραφα 'έχουν σταλεί στον πληρεξούσιο Δικηγόρο.			
Ημερομηνία περάτωσης της έρευνας :		23/07/2024	
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΗΛΟΥΜΕΝΩΝ ΕΓΓΡΑΦΩΝ			
<p>X: ιδιαίτερα σχετικό αν ληφθεί μεμονωμένα Y: ιδιαίτερα σχετικό αν συνδυαστεί με άλλο έγγραφο της ίδιας κατηγορίας A: τεχνολογικό υπόβαθρο O: μη έγγραφη αποκάλυψη P: ενδιάμεσο έγγραφο</p>		<p>T: βασική θεωρία ή αρχή στην οποία βασίζεται η εφεύρεση E: προγενέστερο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, το οποίο δημοσιεύτηκε την ημερομηνία κατάθεσης ή μετά από αυτήν D: έγγραφο αναφερόμενο στην αίτηση L: έγγραφο αναφερόμενο για άλλους λόγους ..... &amp;: μέλος της ίδιας οικογένειας ευρεσιτεχνιών, αντίστοιχο έγγραφο</p>	