الجمهورية العربية السورية
جـــامعـــــة دمشـــــق
كـــلـيـــة الـــزراعـــة
قســـم علـــوم الأغـذيـــة

دراسة استعمال الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Chlorella vulgaris* المعزول محلياً كمدعّم غذائي

رسالة مقدمة لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

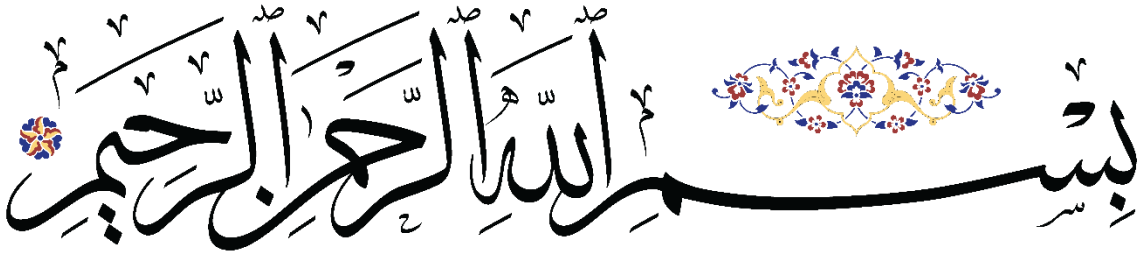
إعداد



المشرف الرئيس
أ. د. سمير سليق
قسم علوم الأغذية
كلية الزراعة – جامعة دمشق

المشرف المشارك
د. حسام عكّو
قسم التنوع الحيوي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

دمشق 15/ 10/ 2023


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

هَٰذَا خَلْقُ اللَّهِ فَأَرُونِي مَاذَا خَلَقَ

الَّذِينَ مِن دُونِهِ ۚ بَلِ الظَّالِمُونَ فِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ

لقمان: 11

قُدِّمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الأغذية، قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة، جامعة دمشق. نوقشت هذه الرسالة في جلسة علنية بتاريخ 15 /10/ 2023 وأجيزت أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة:

This dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food science, at Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Damascus University. The dissertation has been approved by referee committee on the 15th of October 2023.

عضواً

الأستاذ الدكتور: صـيّاح أبـو غـرّة

قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة– جامعة دمشق

مشرفاً

الأستاذ الدكتور: ســـمير ســـليـق

قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة – جامعة دمشق

عضواً

الأستاذ الدكتور: عدنان علي نظام

قسم علم الحياة النباتية– كلية العلوم– جامعة دمشق

شـــهادة

نشـهد بأنَّ هذا العمل الموصـوف في هذه الأطروحة بعنوان" **دراسـة اسـتعمال الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Chlorella vulgaris* المعزول محلياً كمدعّم غذائي**" هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة **بثينة نوري السلامة** بإشراف **الدكتور سمير سليق** (الأستاذ في قسم علـــوم الأغذيـــة، كلية الزراعة بجامعة دمشق)، و**الدكتور حسام عكّو** (الباحث في قسم التنوع الحيوي، الهيئـة العامـة للتقانـة الحيويـة)، وإنَّ أي مرجع ورد في هذه الرسالة موثَّق في النص.

بإشـــراف

المرشَّحة	**الدكتور**	**الدكتور**
بثينة نوري السلامة	**سمير سليق**	**حسام عكّو**

Certificate

We hereby certify that the work described in this dissertation entitled "**Study of using the Dry Biomass of Indigenous Isolated *Chlorella vulgaris* as a food additive**" is the result of **Buthainah Nouri Alsalamah** own investigations under the supervision of **Dr. Sameer Slik**, (Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Damascus University), and **Dr. Hussam Okkou**, (Researcher, Department of Biodiversity, National Commission for Biotechnology: NCBT), and any reference of other researcher's work has been duly acknowledged in the text**.**

Candidate	**Supervisors**	
Buthainah Nouri Alsalamah	**Dr. Sameer Slik**	**Dr. Hussam Okkou**

تصريـــــــــــــــــح

أصـــرَّح بأنَّ البحث الموصـــوف في هذه الأطروحة بعنوان"**دراســـة اســـتعمال الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Chlorella vulgaris* المعزول محلياً كمدعّم غذائي**" لم يســـبق أن قُدِّم للحصـــول على شهادة، وغير مقدَّم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشَّحة

بثينـة نـوري السـلامـة



تاريخ 15/10/2023

Declaration

I declare that the present research entitled: **"Study of using the Dry Biomass of Indigenous Isolated *Chlorella vulgaris* as a food additive"** has not been submitted concurrently for any other degree.

Candidate

Buthainah Nouri Alsalamah



Date: 15/Oct/2023

الإهداء

إلـــهـي . . . .

كلّ توفيقٍ لي كان منك، وكلّ هدايةٍ لي كانت فضلك، وكل نورٍ كان من نورك . .

وكل كلمةٍ وفكرةٍ كانت من إلهامك . . . . فالحمد لله حمداً كثيراً حتى ينقضي النّفَس . . .

. . . . . .

إلى الذي أفنى عمره من أجلنا . . . . والدي رحمه الله

إلى التي غمرني دعاؤها بالسلامة والنوفيق . . . . والدتي الغالية

إلى الطيبات اللواتي تحمّلن انشغالي . . . أخواتي؛ عواطف . . خلود . . آلاء

إلى السَّمْح اللين ذي الأثر البيّن . . . . أخي عاطف (نور الدين)

إلى أنسي وروضتي في الحياة . . . . أهلي وصديقاتي

إلى رفيقات الدرب . . . . آلاء . . صفاء . .

إلى الاستثناء في الأخوة واللطف . . . . لنا . . نور . . إناس . . خولة . . حسام

إلى اللطفاء في هذا العالم الذين تجعلون الحياة أسهل . . .

إلى كلّ من أعطى شيئاً من السعادة . . .

إلى كلّ من رسم بسمة على شفة . . .

شكر

الحمد لله وحده والفضل منه وإليه؛ أكرمني ومنّ عليّ، فاللهم لك الحمد حمداً كثيراً طيباً، وفي هذا المقام أوجه الشكر والعرفان بالجميل إلى أستاذي الراقي؛ مشرفي الرئيس الأستاذ الدكتور سمير سليق، وإلى أستاذي زارع الخير مشرفي المشارك الدكتور حسام عكو، على كريم توجيههما وإرشادهما بسعة صدر لا حدود لها، أسال الله أن يكافئهما بكل خير، والشكر والتقدير لأساتذتي الأجلّاء المُحكمين كبار القامة؛ الأستاذ الدكتور صياح أبو غرّة، والأستاذ الدكتور عدنان علي نظام، لتكرمهما بقبول مناقشة الرسالة، إذ شرفت بحضورهما ومراجعاتهما السديدة، جزاهما الله خيراً.

وأشكرهم جميعاً على ثنائهم العطر علينا وتعاملهم الراقي، ومدين جداً لدعمهم الرمزي بإقرار جهدي وتقديره.

ومنهم إلى الطاقم الإداري وأساتذتي في كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية خاصة، لي أن أشرف بهم جميعاً.

كذلك، أود أن أتقدم بالشكر الجزيل للهيئة العامة للتقانة الحيوية؛ الداعمة لهذا البحث، ولكل من التقيناهم، وأعطونا من وقتهم وتجربتهم وظنّوا فينا حسنا، وتحملوا ثِقل بعض أسئلتنا؛ الأساتذة: محمد صياح نويدر، م. نزار إدلبي، م. إيمان كريّم، د. أسيل الأزعط، د. رضوان بدر الدين، د. لؤي الرفاعي، والدكتور إسماعيل الصالح الموهوب كثيف الحضور، خفيف الرفقة، ولكلّ من قدم لي يد عون لإنجاز هذا العمل، كلٌّ منهم بشخصه وصفته، وشكراً خاصاً للدكتور عصام قاسم؛ له منا وافر الاحترام والامتنان.

والشكر موصول لكل الذين كانوا معي بقلوبهم ورافقوني بدعواتهم، ولرفاقٍ شاركوني جوانب من هذا العمل د. عبير ديوب، د. فردوس كورجك، د. محمد العقاب، آسيا خطاب، د. لنا سيال ونور ميداني.

يَسعد قلبي "بتشكرات جزيلات" إلى حدّ عظيم لأصحاب أكفاء وأخوة حقيقيين طيبون بالاستثناء؛ صفاء ولنا ونور وإناس وخولة وحسام... والله أسأل أن يزيدهم توفيقاً إلى توفيق، ونجاحاً إلى نجاح.

والحمد لله على ما وفّق وفتح... والحمد لله أولاً وآخراً.

قائمة المحتويات

قائمة الجداول IV
قائمة الأشكال V
قائمة الاختصارات Abbreviations VI
الملخص VII
المقدمة Introduction I
مبرّرات البحث 6
أهداف البحث 6
تساؤلات البحث 6
فرضيات البحث 7
محدوديات البحث 7
الفصل الأول: الدراسة المرجعية Literature Review 8
1.1 تصنيف الطحالب الدقيقة Microalgae Classification 9
1.2 تعريف الطحالب Algae identification 10
1.2.1 التعريف المورفولوجي للطحالب 11
1.2.2 التعريف الجزيئي 13
1.3 القيمة الغذائية للطحالب 15
1.4 التدعيم الغذائي 23
1.4.1 استخدام الطحالب في الغذاء 25
1.4.2 تدعيم الوجبات الخفيفة – البسكويت 27
الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه Materials and Methods 29
2.1 مكان تنفيذ الدراسة 30
2.2 التعريف الجزيئي للنوع *Chlorella vulgaris* 30
2.2.1 تضخيم المنطقة 18S rDNA في التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR 31
2.2.2 الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR 32
2.2.3 تحضير ناتج التفاعل للتحليل في جهاز تحديد التتابعات الآلي Sequencer DNA ... 32
2.2.4 التحليل الوراثي 34

2.3 تنمية الطحلب وإكثاره 34
2.4 استحصال الكتلة الحيوية للطحالب كمادة جافة 35
2.5 إضافة الكتلة الجافة للطحلب إلى منتج غذائي 35
2.6 التحليل الكيميائي للكتلة الحيوية الجافة للطحلب ومعاملات البسكويت 36
2.6.1 تقدير الرطوبة 36
2.6.2 تقدير البروتين 36
2.6.3 تقدير مضادات التأكسد 36
2.6.4 تقدير بعض الفيتامينات 37
2.6.5 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية 38
2.7 الاختبار الحسي 39
2.8 التحليل الإحصائي 40
الفصل الثالث: النتـائـج والمنـاقشـة Results and Discussion 41
3.1 التعريف الجزيئي للنوع *Chlorella vulgaris* 42
3.1.1 تحديد ومقارنة تتابعات منطقة 18S rDNA 42
3.1.2 إنشاء شجرة القرابة الوراثية 45
3.2 التحليل الكيميائي للكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Chlorella vulgaris* 51
3.2.1 تقدير البروتين 51
3.2.2 تقدير مضادات التأكسد 52
3.2.3 تقدير الفيتامينات 53
3.2.4 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية 55
3.3 التحليل الكيميائي لمعاملات تدعيم البسكويت 57
3.3.1 تقدير الرطوبة 57
3.3.2 تقدير البروتين 58
3.3.3 تقدير الفيتامينات 60
3.3.4 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية 62
3.4 الاختبار الحسي 64
3.4.1 تقييم مستوى الرهاب من الغذاء الجديد FNS 64
3.4.2 دراسة الارتبـاط بين مستوى الرهاب من الغذاء الجديد FNS والعمر والجنس 65
3.4.3 دراسة تأثير الجنس والعمر ومستوى الرهاب FNS في التقييم الحسي 66
3.4.4 دراسة الفروق بين معاملات البسكويت حسياً 67

3.4.5 تقييم نية الشراء 70

الفصل الرابع: الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations 72

الاستنتاجات..... 73

التوصيات 74

المراجع References..... 75

الملحق Appendix..... 96

قائمة الجداول

الجدول 1. التركيب الكيميائي لبعض أنواع الطحالب الدقيقة والأغذية التقليدية كنسبة مئوية من الوزن الجاف 16

الجدول 2. مقارنة محتوى البروتين من الحموض الأمينية للنوع *C. vulgaris* وغيره من المصادر الغذائية، والنموذج المرجعي للبروتين المتوازن الذي تقترحه منظمة الصحة العالمية WHO والأغذية والزراعة FAO 17

الجدول 3. تركيز بعض المعادن في كل من الكتلة الجافة للطحلب *C.vulgaris* وفي الطحالب الدقيقة..... 18

الجدول 4. الاحتياج اليومي للإنسان من بعض المعادن حسب (FDA، 2019)، وتركيزها في النوع *C. vulgaris* .. 19

الجدول 5. محتوى الفيتامينات في الطحلب *Chlorella* لكل 100 غرام كتلة حيوية جافة..... 21

الجدول 6. التتابع النوكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تفاعل تضخيم المنطقة 18S rDNA..... 31

الجدول 7. مكونات تفاعل PCR لتضخيم المنطقة 18S rDNA..... 31

الجدول 8. البرنامج الحراري لتفاعل PCR لتضخيم منطقة 18S rDNA 32

الجدول 9. مكونات تفاعل PCR لتحديد التتابع النوكليوتيدي..... 33

الجدول 10. البرنامج الحراري لتفاعل Cycle sequencing 33

الجدول 11. المواد المضافة في معاملات البسكويت مقدرة بالوحدة g100/g..... 35

الجدول 12. توزع المشاركين في الاختبار الحسي وفقاً لجنس الفرد والعمر (بالأعوام) للمشاركين في الاختبار الحسي . 40

الجدول 13. بعض نتائج مقارنة التتابع المدروس بالتتابعات المسجلة في NCBI باستخدام BLAST..... 43

الجدول 14. النسبة المئوية لمحتوى البروتين في كل من البسكويت الشاهد والمدعّم، والنسبة المئوية لما يغطيه 100 g من البسكويت اعتماداً على الاحتياج اليومي للبروتين حسب FDA..... 59

الجدول 15. النسبة المئوية لما يغطيه 100g بسكويت من الفيتامين B_{12}، C من الاحتياج اليومي حسب FDA..... 62

الجدول 16. النسبة المئوية للرماد وتركيز بعض المعادن في كلٍّ من البسكويت الشاهد والمدعَّم. 63

الجدول 17. النسبة المئوية لما يغطيه 100g من البسكويت اعتماداً على الاحتياج اليومي للمعادن حسب FDA، والنسبة المئوية للفرق بين البسكويت المدعم والشاهد. 63

الجدول 18. متوسط درجات تقييم معاملات البسكويت وفق المعايير الحسية (من أصل 5) للمشاركين في الاختبار الحسي وفقاً لجميع المعايير في الاختبار..... 67

قائمة الأشكال

الشكل 1. رسم تخطيطي يمثل تصنيف الطحالب بين الأحياء 9

الشكل 2. الصفات المورفولوجية للنوع *C. vulgaris* 12

الشكل 3. رسم تخطيطي لوحدةrDNA عند حقيقيات النواة 14

الشكل 4. نموذج مرجعي للعلاقة بين العوامل المؤثرة في سلوك المستهلك معرفة المستهلكين بالأغذية الوظيفية 24

الشكل 5. السلسلة العيارية للفيتامين C 37

الشكل 6. المنحنى العياري ومعادلة خط الانحدار للعلاقة بين الامتصاصية OD420nm وتركيز الفوسفور 39

الشكل 7. الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز، A: حزمة الدنا DNA الكلي في هلامة الأغاروز 1%، B: الحزمة الناتجة عن تضخيم منطقة 18S rDNA في تفاعل PCR، في هلامة الأغاروز 2% 42

الشكل 8. السجل الخاص بإيداع العينة في قاعدة بيانات البنك الوراثي NCBI..... 42

الشكل 9. الاصطفاف المتعدد لتتابعات منطقة 18S rDNA للعينة المدروسة باستخدام طريقة ClustalX 46

الشكل 10. شجرة القرابة الوراثية بناءً على تتابعات المنطقة 18S rDNA باستخدام طريقة ضم الجوار 49

الشكل 11. خلايا النوع *C. vulgaris* المدروس تحت المجهر الضوئي 50

الشكل 12. تغير نسبة الرطوبة في معاملات البسكويت 58

الشكل 13. تغير تركيز الفيتامين B_{12} بإضافة كتلة الطحلب في معاملات البسكويت..... 61

الشكل 14. تغير تركيز الفيتامين C بإضافة كتلة الطحلب في معاملات البسكويت..... 61

الشكل 15. توزع المشاركين في الاختبار الحسي وفقاً لجنس الفرد وحالة الرهاب من الغذاء الجديد. 65

الشكل 16. نتائج الاختبار الحسي لمجموع 28 مشاركاً 69

الشكل 17. نتائج تحديد المنتج الأفضل برأي المشاركين في الاختبار الحسي. 70

الشكل 18. نتائج تقييم نية الشراء للمشاركين في الاختبار الحسي. 71

Abbreviations قائمة الاختصارات

Abbreviation	Name	Abbreviation	Name
ng	NanoGram	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
µg	Microgram	MSA	Multiple Sequence Alignment
mg	MilliGram	NJ	Neighbor joining
µM	MicroMolar	NORs	Nucleolus Organizer Regions
mM	MilliMolar	PCR	Polymerase Chain Reaction
µl	MicroLiter	ITS	Internal Transcribed Spacer
ml	Milliliter	FDA	Food and Drug Administration
L	Liter	WHO	World Health Organization
Xg	Gravitational Force	EC	European Commission
nm	NanoMeter	FAO	Food and Agriculture Organization
bp	Base Pair	GRAS	Generally Recognise As Safe
S	Svedberg unit	FNS	Food Neophopia Scale
MW	Molecular Weight	RDA	Recommended Dietary Allowances
RNA	Ribonucleic Acid	ROS	Reactive Oxygyn Speciese
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid	AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DNA	Deoxyribonucleic Acid	NREL	National Renewable Energy Laboratory
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid	CEN	European Committee for Standardization
dNTPs	Deoxynucleotides	ISO	International Organization for Standardization
ddNTPs	Dideoxynucleotides	EN	European Standards/ European Norm
SSU rDNA	Small Subunit Ribosomal DNA	HPLC	High-performance liquid chromatography
LSU rDNA	large subunit Ribosomal DNA	UV	Ultra Violet
EAA	Essential Amino Acids	BBM	Bold's Basal Medium
MPA	Meta-Phosphoric Acid	WHC	Water Holding Capacity
DHA	Docosahexaenoic Acid	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EPA	Eicosapentaenoic Acid	TBE	Tris-Boric acid-EDTA
LC-PUFA	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids	NCBI	National Center for Biotechnology Information
ExoSAP	Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase	HHS	U.S. Department of Health and Human Services

الملخص

نشأت الحاجة إلى إنتاج أغذية صحية من مصادر مختلفة لتحسين الصحة وتحقيق الرفاهية الغذائية، وأظهرت الطحالب الدقيقة جدواها في ذلك، وأصبح تعريف الطحلب أمراً لازماً في منتج تجاري للطحالب يمتلك ميزة فريدة خاصة بنوع الطحلب الذي يحتويه؛ لذلك هدف هذا العمل إلى تأكيد هوية الطحلب *Chlorella vulgaris* المعزول محلياً من المياه العذبة بالطرائق الجزيئية والمعرَّف شكلياً مسبقاً، ودراسة استثمار الكتلة الحيوية الجافة لهذا الطحلب كمدعّم غذائي للبسكويت. أُجري البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وأُخذ النوع نقياً من مختبر تقانات الطحالب في الهيئة، وتم سلسلة جزء من المنطقة 18S rDNA بطول 629bp، وأُعطي رقم الدخول OM019107 في NCBI، كأول محاولة محلية للمساهمة في قاعدة بيانات للطحالب. أظهرت النتائج تأكيد هوية العينة نظراً إلى التشابه مع الجنس *Chlorella* بنسبة 99.8%، ومع النوع *C. vulgaris* بنسبة 97.8%، ودعم ذلك الخصائص المورفولوجية. أُضيفت الكتلة الحيوية المجفَّدة للطحلب إلى البسكويت بنسبة 1% و3% و5%، وقُدِّرت نسب الرطوبة والبروتين ومضادات التأكسد والرماد وبعض الفيتامينات والمعادن في هذه الكتلة وكل من البسكويت الشاهد والمدعَّم. بينت النتائج غنى كتلة الطحلب بالبروتين (40.54%)، والرماد (11%) الذي ارتفعت فيه نسبة كل من K وP وFe، وحققت فعاليتها المضادة للتأكسد 2.37 ضعفاً من فعالية الفيتامين C (IC_{50}= 116 mL/mg)، كما كانت غنية بالفيتامين B_{12} (2.764 g/mg) والفيتامين C (914.583 g/gμ) بنسب يمكن مقارنتها بتلك في النباتات. في البسكويت، تناقص محتوى الرطوبة مع زيادة نسبة الطحلب؛ مما يقلّل النشاط المائي ويطيل فترة التخزين. وحقق البسكويت المدعَّم زيادةً معنويةً عن الشاهد في جميع المكونات المقدَّرة؛ 100g بسكويت مدعَّم يمكن أن تزيد على الشاهد في تغطية الحاجة اليومية من البروتين (1.15 ضعفاً)، الفيتامين C (4 أضعاف)، الفيتامين B_{12} (19 ضعفاً)، ومن العناصر K، Fe، Mn، Cu، P (1.25، 8، 2، 6، 2 ضعفاً، على الترتيب)، ويمكن تقديمه في حالات عوز Fe، أو نقص الفيتامين B_{12} عند ذوي الحمية النباتية. أظهرت نتائج الاختبار الحسي وجود فرق معنوي بين الشاهد ومعاملات التدعيم كافة، وحصل التدعيم 5% –الأقل قبولاً– على تقييم مرتفع (5/3). وعليه، فإن الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* مدعِّم غذائي ناجح للبسكويت يغنيه بالمعادن والبروتين والفيتامين B_{12} وC ومضادات التأكسد.

الكلمات المفتاحية: *chlorella vulgaris*، الطحالب الدقيقة، 18S rDNA، البسكويت، التدعيم الغذائي.

Introduction المقدمة

المقدمة Introduction:

أدى التوسع في الصناعات الغذائية الحديثة إلى انتشار واسع للمنتجات الأقل كلفة والأكثر صحة (Soltani، وآخرون، 2016)، وازداد الطلب على المنتجات الطبيعية؛ فالمستهلك أصبح لا يسعى إلى تأمين حاجته من الطعام وحسب، ولكنه يحاول أيضاً تحسين رفاهته الغذائية ومنع الأمراض المرتبطة بالغذاء (Menrad، 2003). أشارت منظمة الصحة العالمية WHO (2022) إلى أن الأمراض الناجمة عن نمط الحياة هي واحدة من أخطر التحديات أمام الطب في القرن الحادي والعشرين، إذ يعاني مليارا شخص على الأقل حول العالم مما يطلق عليه "الجوع الخفيّ" فلا يتناولون كفايتهم من المغذيات الصغرى؛ الفيتامينات والمعادن (Kraemer، وآخرون، 2012)، حتى إن اتفاق كوبنهاغن، في عام 2012، منح التدابير الخاصة بإدخال المغذيات الصغرى في حملات مكافحة الجوع وتحسين التعليم تصنيف أذكى أسلوب لتوظيف الأموال في مجال الاستجابة لأكبر عشر تحديات في العالم (Kraemer، وآخرون، 2012)، كما ضمّنت الولايات المتحدة الأمريكية 2015–2020 (health.gov) إرشاداتها الغذائية بنداً يدعو إلى اختيار الأغذية الأكثر صحية (HHS، 2015)؛ لذلك، كان على الصناعات الغذائية أن تتطور وتكيف تقنياتها ومنتجاتها لتلبية احتياجات المستهلكين ومتطلباتهم (Mathys & Caporgno، 2018)، ونشأت الحاجة لتقييم مصادر مختلفة لإنتاج أغذية وظيفية صحية (Seyidoglu، وآخرون، 2017)، الأمر الذي يلقي بالضوء على الطحالب الدقيقة التي تمتلك معدلات نمو عالية ويسهل التعامل معها، ولا تحتاج سوى الضوء والماء لتنمو بفعالية (Bozarth، وآخرون، 2009؛ Yan، وآخرون، 2017)، وتحول العناصر المغذية إلى كتلة حيوية بفعالية (Hong & Liu، 2021)، إذ إن إنتاج الكتلة الحيوية للدونم الواحد يزيد على النباتات الوعائية (Shay، 1993)، فضلاً عن فوائدها الصحية بما تنتجه من مركبات فعّالة (Machu، وآخرون، 2015؛ Galasso، وآخرون، 2019).

الطحالب algae، عموماً، مجموعة متنوعة من الأحياء ذات التركيب الضوئي (Dahiya، 2014)، تعيش في جميع البيئات (Schenk & Lim، 2017)، ويعود تاريخ ظهورها إلى نحو 3.5 مليار سنة، وتقسم إلى طحالب كبيرة macroalgae بطول يصل إلى 60 متراً وأكثر، وطحالب دقيقة microalgae بحجم صغير يصل إلى 0.2

ميكروناً (Christaki، وآخرون، 2011). والطحالب الدقيقة أكثر تنوعاً من تلك الكبيرة؛ من بين 200 ألف– مليون نوع من الطحالب كافة، يُعتقد أنها موجودة في جميع أنحاء العالم (Norton وآخرون، 1996)، أو حتى ما يفوق ذلك (Guiry، 2012)، فإن 200 ألف إلى 800 ألف نوع منها تعود للطحالب الدقيقة فقط (Wolkers، وآخرون، 2011) ص9، بل إن الطحالب الدقيقة تتفوق على الكبيرة أيضاً في ادخار المغذيات (Mota، وآخرون، 2023)، وتساهم مثل النباتات في تثبيت الكربون الجوي وهي وحدها المسؤولة عن تثبيت 50–60٪ من ثنائي أكسيد الكربون في الكوكب (Rodríguez-Salinas، وآخرون، 2012)، وتُستخدم في معالجة مياه الصرف الصحي بيولوجياً (González، وآخرون، 1997؛ Hong & Liu، 2021).

إن تنمية الطحالب الدقيقة عملية عديمة المخلفات wasteless، ونظيفة بيئياً، توفر في الطاقة والموارد (Rath & Priyadarshani، 2012)، وتجنب استخدام المبيدات (Abdel-Karim, *et al.*, 2020). وقد بدأ استخدامها، خلال العقدين الأخيرين، يأخذ مساراً جديداً مع استنفاد احتياطي الوقود الأحفوري، وارتفاع أسعار النفط وزيادة القلق بشأن الاحتباس العالمي (Safi، وآخرون، 2014)، كذلك أصبحت أساسية في صناعة مستحضرات التجميل؛ تستعمل كعوامل تكثيف وترطيب وحماية من الأشعة فوق البنفسجية ومضادات التأكسد، وهي أساس الملونات فيه (Sahasrabuddhe & Vaibhav، 2018؛ Marino، وآخرون، 2020)، إضافة إلى احتوائها على مكونات مضادة للشيخوخة وتلون البشرة (Favas، وآخرون، 2021)، إلا أن 75% من الإنتاج السنوي يجري استغلاله في الصناعات الغذائية (Galasso، وآخرون، 2019)، فالطحالب الدقيقة كانت مصدراً غذائياً تقليدياً لأجيال في جميع أنحاء آسيا وأفريقيا (Szabo، وآخرون، 2013)، وظهرت، خلال العقود الماضية، إمكان استخدام المركبات المشتقة من الطحالب الدقيقة أو الخلايا الكاملة منها في المنتجات الغذائية أو الوظيفية (Caporgno & Mathys، 2018).

ويعدُّ الجنس *Chlorella* من أكثر طحالب المياه العذبة الدقيقة الخضراء من حقيقيات النواة استعمالاً في تغذية الإنسان (Misurcova وآخرون، 2012)، فهو يعطي كتلة حيوية كبيرة في وحدة المساحة (10 – 40 g وزناً جافاً/m^2 يومياً)؛ مما يمنحه أهمية اقتصادية عالية (Piorrec وآخرون، 1984) جعلته يحتل المرتبة الثانية

عالمياً بعد السبيرولينا المجففة (Garcia، وآخرون، 2017؛ Wang، وآخرون، 2020)، وبدأ الإنتاج التجاري الضخم في أوائل الستينيات في اليابان، لتتبعها دول أخرى مثل الولايات المتحدة الأمريكية والهند وفلسطين وأستراليا في السبعينيات والثمانينيات من القرن العشرين (Spolaore وآخرون، 2006) واحتلت تايوان رتبة أكبر منتج للكلوريلا بإنتاج بلغ 400 طن/ سنة تليها شركة ألمانية بإنتاج 130–150 طن/ سنة (Koyande، وآخرون، 2019). وازدادت الأهمية الاقتصادية لهذا الطحلب، وتأسس حتى اليوم أكثر من 70 شركةً منتجةً لجنس *Chlorella* (Spolaore، وآخرون، 2006)، تنتج نحو 5 آلاف طن من منتجات الكلوريلا *Chlorella* كل عام (Sathasivam، وآخرون، 2017). وتأتي أهمية الكلوريلا *Chlorella* من خصائصه الغذائية والصحية إذ تم منحه الوضع القانوني GRAS في إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA (Garcia، وآخرون، 2017؛ Islam، وآخرون، 2018)، كما أدرجته المفوضية الأوروبية EC في دليل الأطعمة الجديد (Ramos-Romero، وآخرون، 2021). وتعود هذه الأهمية لأوائل عام 1900 عندما استرعى هذا الجنس من الطحالب انتباه الألمان كمصدر غذائي غير تقليدي بما يحتويه من بروتين (Spolaore، وآخرون، 2006)، بعد أن كشفت دراسة أجراها كل من Jorgenson وConvit (1940) على مرضى للجذام في فنزويلا زيادة في وزنهم ومستوى الطاقة والصحة لديهم عموماً نتيجة تغذيتهم بحساء *Chlorella* sp. كمكمّل غذائي، فكانت أول دليل موثّق على إمكان استخدام الطحالب الدقيقة كمكمل صحي واعد (Rani، وآخرون، 2018)، الأمر الذي أدى إلى ازدياد الأهمية الاقتصادية لهذا الجنس الذي يحوي النوع *C. vulgaris*؛ النوع الأكثر الشعبية من هذا الجنس على وجه الخصوص (Moore، 2001)، إذ لا يزال يُستخدم كدواء بديل في الشرق الأقصى منذ العصور القديمة (Gouveia، وآخرون، 2008؛ Soltani، وآخرون، 2016)، فهو يعزز الصحة في حالة الاضطرابات، مثل: قرحة المعدة، والجروح، والإمساك، وفقر الدم، وارتفاع ضغط الدم، وسوء التغذية عند رضّع داء السكري diabetes infant malnutrition والعُصاب، ويساهم أيضا في الوقاية من تصلب الشرايين وارتفاع كولسترول الدم (Balaji، وآخرون، 2017). في خمسينيات القرن العشرين، تولَّى معهد كارنيغي Carnegie في واشنطن دراسة طحلب الكلوريلا الشائع *Chlorella vulgaris* واستطاع أن ينمّيه على نطاق واسع للحدّ من ثنائي أكسيد الكربون (Burlew، 1953)، وتم استهلاكه كطعام

صحي وظيفي في تايوان واليابان والمكسيك (Sathasivam، وآخرون، 2017)، فهو آمن للاستهلاك البشري ولا ينتج السموم (Enzing، وآخرون، 2014)، ومن المتوقع أن يحقق سوق مكونات الكلوريلا *Chlorella* معدَّل نموّ سنوي مركباً يبلغ 6.30%، ليصل إلى نحو 500 مليون دولار أمريكي بحلول عام 2029 حسب تحليلات أبحاث السوق Data Bridge Market Research لعام 2021. وعليه، أضحى ضمان جودة الكتلة الحيوية الطحلبية ومنتجاتها أولوية عليا للصناعة (Görs، وآخرون، 2009)، وقُدّمت اقتراحات ودعوات لإشراك اللجان الدولية مثل جمعيات علم الطحالب phycology أو منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (الفاو FAO) لوضع مبادئ توجيهية عملية لضمان هذه الجودة (Görs، وآخرون، 2009). التي ما من ضوابط موحّدة لضمانها، بل تُحدَّد المعايير وادّعاء الجودة ووضعها على المنتجات من قبل المنتجين والموزعين أنفسهم في الغالب (Grobbelaar، 2003) وبما يتوافق مع الضوابط regulations الخاصة بسلامة الأغذية في كل دولة على حدة (Görs، وآخرون، 2009)، فهي لا تندرج ضمن فئات الأغذية أو الأدوية المجازة قانونياً بل تحتل منطقة رمادية بين كليهما (Grobbelaar، 2003؛ Berry & Gulati، 2006)، وتُعرّف بأنها مغذيات nutraceuticals (Berry & Gulati، 2006).

تبرز أهمية البحث من إمكان الجمع بين التركيب الكيميائي المميز والخصائص الوظيفية الاستثنائية للطحالب الدقيقة والغذاء في منتج غذائي هو أعلى قيمة غذائية ومقبول حسياً، كما أن وجود أنواع دخيلة على منتجات نوع بذاته من الطحالب مثل طحلب الكلوريلا *Chlorella* لا يزال غير واضح التأثير حتى الآن، تحت ظرف غياب التحليلات الكيميائية لهذه الأنواع (Görs، وآخرون، 2009). وهذا يبرر الحاجة الملحة إلى تحليل تعريف الطحلب عند الإعلان عن إنتاج الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المنتج بجودة عالية وامتلاكها لميزات فريدة خاصة بنوع الطحلب هذا (Görs، وآخرون، 2009). ليس ذاك فقط، بل إن تعريف النوع أمر لا مفرّ منه أيضاً عند إيداع سلالات جديدة معزولة ذاتياً لرفد تلك المودعة في مجموعات الاستزراع المصرّح بها دولياً _تلك التي تسجّل هوية الأنواع باستخدام التقانات الجزيئية، لاستخدامها في الإكثار والحفاظ على الجودة بأعلى مستوى ممكن (Görs، وآخرون، 2009).

مبرّرات البحث

تمتلك الطحالب أهمية خاصة؛ لانتشارها الواسع محلياً من جهة، بما يصلح للاستثمار التجاري في البيئة السورية بالنظر إلى ارتفاع درجات الحرارة وفترات الإشعاع الشمسي الطويل، وما تتميز به من خصائص وظيفية وتركيب كيميائي من جهة أخرى، فهي مورد محلي يستحق الاهتمام لاستخدامه في الصناعات التحويلية والدوائية والغذائية، وبمزايا وفوائد كبيرة مقارنة مع تلك الشائعة.

أهداف البحث

هدف هذا البحث إلى تعريف طحلب الكلوريلا الشائع *Chlorella vulgaris*، المعزول من المياه العذبة المحلية، جزيئياً، ودراسة استثمار الكتلة الحيوية الجافة لهذا الطحلب كمدعِّم غذائي، ليكون من أوائل الأبحاث المحلية التي تصنف الطحالب الخضراء الدقيقة المعزولة محلياً جزيئياً وتتناول استخدامها في الأغذية، من خلال الآتي:

1. تأكيد هوية الطحلب *Chlorella vulgaris*، المعزول محلياً من المياه العذبة، والمعرّف شكلياً مسبقاً، باستخدام الطرائق الجزيئية.
2. دراسة بعض مكونات الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس.
3. استخدام الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس كمدعم غذائي للبسكويت؛ المنتج الغذائي الشائع تناوله.

تساؤلات البحث

1. هل يمكن الاستعاضة عن التصنيف الشكلي بذاك الجزيئي في تحديد هوية الطحلب *Chlorella vulgaris*؟
2. هل تحديد التتابع الجزئي للمنطقة 18S rDNA كافٍ لتحديد هوية الطحلب *C. vulgaris* جزيئياً؟
3. هل تمتلك الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* مركباتٍ فعّالة تتيح استخدامها في التدعيم الغذائي؟
4. هل لإضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* في البسكويت أثر في رفع القيمة الغذائية له؟
5. هل تؤثر إضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* في الصفات الحسية للبسكويت؟
6. هل يؤثر مستوى الرهاب الغذائي في درجة قبول المستهلك للبسكويت المدعَّم بكتلة الطحلب *C. vulgaris*؟

فرضيات البحث

1. انطلاقاً من حقيقة وجود جنس الكلوريلا *Chlorella* منذ العصر ما قبل الكامبري، فإنه من المتوقع أن تكون المورثة 18S rDNA قادرة على تحديد هوية الطحلب.
2. نظراً إلى تاريخ استهلاك الشعوب للطحلب *C. vulgaris* وبعد الرجوع إلى الأدبيات المنشورة حول قيمته الغذائية فإنه يمكن استخدام الكتلة الحيوية الجافة لهذا الطحلب في رفع القيمة الغذائية للبسكويت.
3. استخدام الكتلة الحيوية الجافة للطحلب في تدعيم البسكويت ليس له أثر في صفاته الحسية.

محدوديات البحث

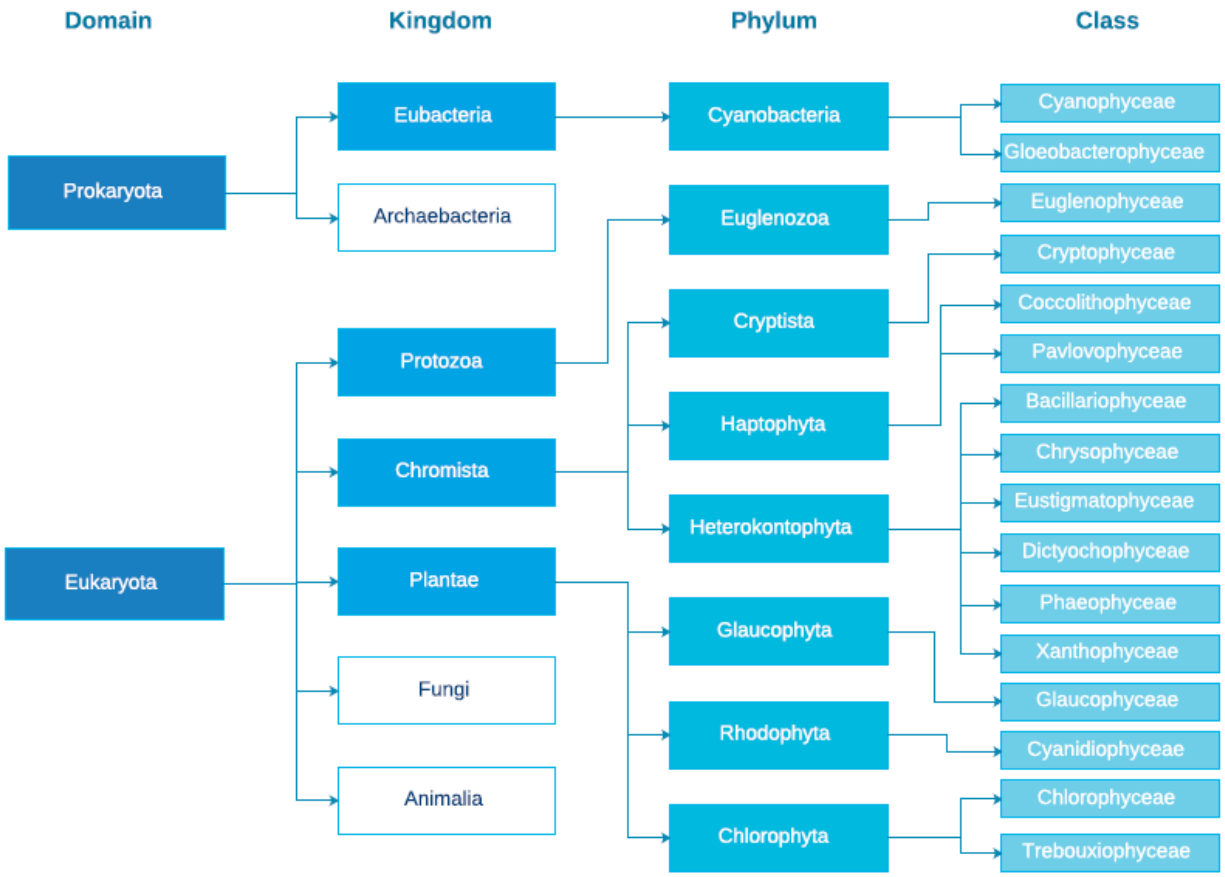
1. الاعتماد على تحليل منطقة مورثية واحدة في تحديد هوية الطحلب *C. vulgaris*.
2. ضعف الإمكانات وعدم توفر التجهيزات اللازمة لتحديد تركيب الحموض الأمينية وبقيّة المكوّنات.
3. جميع الذواقة كانوا من حملة الشهادات العلمية دون غيرهم من فئات المجتمع العامة أو حتى الأطفال.
4. عدم إجراء دارسة التيسر الحيوي للمركبات المضافة بإضافة الطحلب.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية Literature Review

1.1 تصنيف الطحالب الدقيقة Microalgae Classification

الطحالب الدقيقة أحياء إمّا بدائية النّوى أو حقيقية النّوى (Rodríguez-Salinas، وآخرون، 2012). أما بدائية النوى منها فإنها تنقسم إلى *Cyanophyta* و*Prochlorophyta*، بينما تتضمن حقيقيات النوى تسعة أقسام؛ *Glaucophyte*، *Rhodophyta*، *Heterokont*، *Haptophyta*، *Cryptophyta*، *Dinoflagellate*، *Euglenophyta*، *Chlorarachniophyta*، *Chlorophyta* (Gualtieri & Barsanti، 2006)، وقد تغير نظام تصنيف الطحالب عدة مرات على مر السنين، ولا يوجد حالياً إجماع بين خبراء التصنيف حول العالم على استخدام تصنيف دون آخر (Huerlimann & Heimann، 2015؛ Malcata، وآخرون، 2019). ومع ذلك، يشتمل أحد أحدث نماذج تصنيف الأحياء على مجالين رئيسين، *Prokaryota* و*Eukaryota* يجمعان سبع ممالك: *Archaebacteria* و*Eubacteria* و*Protozoa* و*Chromista* و*Fungi* و*Plantae* و*Animalia* (Ruggiero، وآخرون، 2015)، الشكل 1.



الشكل 1. رسم تخطيطي يمثل تصنيف الطحالب بين الأحياء (Ruggiero، وآخرون، 2015)

توضع حقيقيات النواة التي تقوم بالتركيب الضوئي حالياً ضمن مجموعة *Archaeplastida*، التي تنقسم إلى *Glaucophyta*، والطحالب الحمراء *Rhodophyta*، والطحالب الخضراء ونباتات الأرض *Chloroplastida* (Rodríguez-Ezpeleta، وآخرون، 2005)، وتشكّل الأخيرة مملكة *Viridiplantae*، حيث نُسبت الطحالب الخضراء فقط إلى شعبة *Chlorophyta* (Rodríguez-Salinas، وآخرون، 2012) صف *Chlorophyceae* (Sheehan، وآخرون، 1998)، التي تتمثل خصائصها المورفولوجية والكيميائية الحيوية الرئيسة في وجود الصانعات الخضراء ثنائية الغشاء وفيها اليخضور a وb والعديد من الكاروتينات التي يمكن اصطناعها تحت ظروف الإجهاد المختلفة مما يتسبب بتغير لون الطحالب (Melkonian، 1990؛ Tomaselli، 2004). من ناحية أخرى، تعد الطحالب الخضراء من أكثر الطحالب الدقيقة شيوعاً، خاصة في المياه العذبة (Neenan، وآخرون، 1986)، إذ يُقدَّر وجود نحو 8000 نوعاً منها، وقد حظيت بالاهتمام الأكبر بين مجموعات الطحالب الأخرى باعتبارها السلف الذي انحدرت منه النباتات (Sheehan، وآخرون، 1998). ينتمي الطحلب موضوع الدراسة *C. vulgaris* إلى حقيقيات النواة *Eukaryota*، مملكة *Plantae*، تحت مملكة *Viridiplantae*، شعبة *Chlorophyta*، تحت شعبة *Chlorophytina* صف *Trebouxiophyceae*، رتبة *Chlorellales*، عائلة *Chlorellaceae*، جنس *Chlorella*، نوع *vulgaris* (Guiry & Guiry، 2020؛ Guiry، وآخرون، 2022).

1.2 تعريف الطحالب Algae identification

تستوطن الطحالب البيئات المائية وتستجيب للتغيرات الكيميائية والفيزيائية والحيوية فيها استجابات جماعية على مستوى الأنواع (Sigee & Bellinger، 2010؛ Schneider، وآخرون، 2011)، تتمثل في تبدل الوفرة النسبية لإحدى الوحدات التصنيفية من الطحالب وفقاً للظروف البيئية المثلى لنموها ومجالات تحمّلها (Stevenson، وآخرون، 2008) وتغير شكل الخلية (Wang، وآخرون، 2005) وحجمها (Lavoie، وآخرون، 2010)، فالتعريف الصحيح لأنواع الطحالب يوفر إمكان التنبؤ بالعديد من هذه التغيرات ويسهل تعميم الاستدلالات البيئية (Stevenson، 2006) لتشمل مناطق جغرافية مختلفة (Kahlert، وآخرون، 2008).

يتم حالياً استخدام طريقتين أساسيتين لتعريف الطحالب: التعريف المورفولوجي الذي يعتمد مزايا مختلفة تُلاحظ تحت المجهر (Sigee & Bellinger، 2015، ص: 141؛ Fawley & Fawley، 2021)، والتعريف الجزيئي الذي يستخدم مجموعة متنوعة من المناطق الجينية (Manoylov، 2014).

1.2.1 التعريف المورفولوجي للطحالب

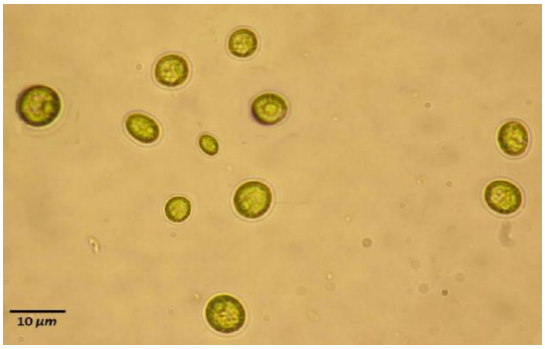
يعتمد هذا التعريف على تمييز الخصائص الشكلية لخلايا الطحلب باستخدام المجهر؛ من مثل شكل الخلية وحجمها ووجود الأشواك أو الأهداب أو السياط أو عدمها والقدرة على الحركة وإفراز الهلام (Sigee & Bellinger، 2015، ص: 141؛ Fawley & Fawley، 2021)، وهو من الصعوبة بمكان بسبب نقص الخصائص المورفولوجية أو التشابهات المورفولوجية بين الأنواع (Huss & Kessler، 1992؛ Huss، وآخرون، 1999)، يضاف إلى ذلك المرونة في شكل بعض الأنواع في المياه العذبة الذي يتنوع بتنوع الظروف البيئية (Kyong، وآخرون، 2001). وقد شدّد Trainor وزملاؤه (1976) على وجوب أن "تدرك عند وصف الأنواع أنه في ظل ظروف فيزيولوجية مختلفة يمكن أن تبدي شكلاً مختلفاً تماماً (Trainor، وآخرون، 1976)، كذلك، يختلف حجم خلية الطحلب إلى حد كبير من نوع إلى آخر، حتى ضمن نفس النوع في مراحل مختلفة من دورة حياتها (Sigee & Bellinger، 2015، ص: 32). لهذا تم تطوير القليل من مفاتيح التعريف المشتركة لجميع مجموعات الطحالب في مناطق جغرافية محددة (Tilden، 1910؛ Geitler، 1931؛ Prescott، 1931؛ Forest، 1954؛ Prescott، 1962؛ Anagnostidis & Komárek، 1989؛ Dillard، 1989؛ Dillard، 2007؛ John، وآخرون، 2011)، ثم التعميم على مناطق أخرى بسبب قلة الدراسات وعدم شموليتها (Manoylov، 2014).

1.2.1.1 التعريف المورفولوجي للطحلب *Chlorella vulgaris*

اكتشف الباحث الهولندي ويليم بييرينك Martinus Willem Beijerinck طحلب الكلوريلا *Chlorella* عام 1890 (Beijerinck، 1890)، وقد دلت الدراسات التطورية على وجود هذا الجنس منذ العصر ما قبل الكامبري قبل 2.5 مليار سنة، ولايزال كيانه الوراثي ثابتاً منذ ذلك الحين (Safi، وآخرون، 2014)، واشتق اسمه من الكلمة اليونانية chloros، التي تعني الأخضر، واللاحقة ella في إشارة إلى حجمه المجهري.

يمثل جنس الكلوريلا *Chlorella* مجموعة من الأنواع المتشابهة شكلياً من أصل متعدد السلف (مشتق من أكثر من سلف تطوري مشترك) polyphyletic origin وليس جنساً طبيعياً (Kessler، 1976). ويظهر ذلك جلياً في التباعد النسبي الكبير نسبياً داخل جنس *Chlorella* (Sogin & Huss، 1990). إذ نُقل العديد من الأنواع الكلوريلا إلى صفوف تطورية phylogenetic classes أخرى تحت ذات الشعبة؛ شعبة الطحالب الخضراء *Chlorophyta* (Huss، وآخرون، 1999؛ Bock & Krienitz، 2012). حالياً، جرى تصنيف ثلاثة أنواع فقط على أنها "كلوريلا حقيقية": *C. vulgaris* و*C. sorokiniana* و*C. lobophora* (Krienitz، وآخرون، 2004).

النوع *Chlorella vulgaris* موضوع الدراسة هو خلايا كروية إلى شبه كروية الشكل غير متحركة، يتراوح قطرها بين 2– 10 ميكرونات، ذات غشاء خلوي رقيق وجدار خلية خالٍ من أي نقاط أو خطوط تزيينية أو أشواك، مع صانعة خضراء وحيدة تملأ الخلية تقريباً ولها شكل كأسي ذو حدود واضحة. توجد خلايا الكلوريلا منفردة أو مجتمعة (Guiry، وآخرون، 2022) الشكل 2، وهي شائعة في المياه الغنية بالمغذيات (Sigee & Bellinger، 2015).



الشكل 2. الصفات المورفولوجية للنوع *C. vulgaris* (عكّو وآخرون، 2017)

عموماً، لا يزال خيار التعريف الشكلي لمجتمعات الطحالب قائماً بذاته من أجل التقييم الحيوي، أو توثيق التنوع الحيوي (Lücking، 2008)، أو مقارنة الطحالب المعرفة مورفولوجياً مسبقاً بنتيجة تعريفها جزيئياً (Will & Rubinoff، 2004).

1.2.2 التعريف الجزيئي

من الجدير الإشارة إلى أن تحديد الأنواع شكلياً قد يكون مُجهداً للغاية؛ يتطلب مهارة كبيرة ومجهراً متقدم التقنية (Fawley & Fawley، 2021)؛ الأمر الذي شجّع التوجّه نحو استخدام التقنيات الجزيئية، فظهر تحليل تتابع الحمض النووي كأهم أداة لاختبار فرضيات تحديد أنواع الطحالب والعلاقات بينها (Leliaert، وآخرون، 2014؛ Manoylov، وآخرون، 2014)، وربما كان اختيار المنطقة الجينية المناسبة هو الخطوة الأكبر صعوبة وأهمية (Dixon & Hillis، 1991؛ Dapra، 2016).

ويتم بشكل عام استخدام العديد من المورثات: *rbc*L و*atp*B و*psa*A من جينوم الصانعات الخضراء، و*cox*1 من جينوم الميتوكوندريا، SSU rDNA من الجينوم النووي (Kollár، وآخرون، 2019؛ Yang، وآخرون، 2020).

1.2.2.1 مورثات تحت وحدات الرنا الريبوزومي rDNA

إن مورثات الرنا الريبوزومي rDNA هي من بين أكثر التتابعات تنوعاً لتحليل النشوء والتطور السلالي للأحياء (Dixon & Hillis، 1991). وتنتمي rDNA إلى فئة عديدة المورثات ويوجد منها بين مئات إلى الألف نسخة على الجينوم الواحد، ويرتبط التباين بين هذه المورثات rDNA أو ضمنها بمعدل التطور، حيث تتطور تطوراً سريعاً نسبياً (Cronn، وآخرون، 2002)، ضمن عملية منسَّقة أو متناغمة Concerted evolution (Dixon & Hillis، 1991؛ Li، 1997)؛ أي إن كل مورثة ضمن الفئة تخضع لنفس التغير الوراثي؛ لذا تعامل جميع نسخ rDNA في الجينوم على أنها مورثة واحدة، ويجعل منها موضوعاً مهماً من أجل الأبحاث الجغرافية البيولوجية Biogeographic (Hsiao، وآخرون، 1994؛ Shinoda & Dubouzet، 1999) وكذلك الدراسات التطورية (Lewis & Hershkovitz، 1996؛ Hershkovitz، وآخرون، 1999)، فهي ذات أهمية كبرى في إعادة رسم المجتمع الحيوي وتوفير رؤية أوسع لبنيته وتكوينه (López-García، وآخرون، 2001)، وأدت إلى اكتشاف كمية هائلة من التنوع الحيوي الخفي (Sogin، وآخرون، 2006). على الرغم من وجود بعض الطفرات النقطية، أو مواضع الحذف والإدخال Indels؛ الأمر الذي يتسبب ببعض التباينات الضئيلة ضمن النوع (Baldwin، 1992).

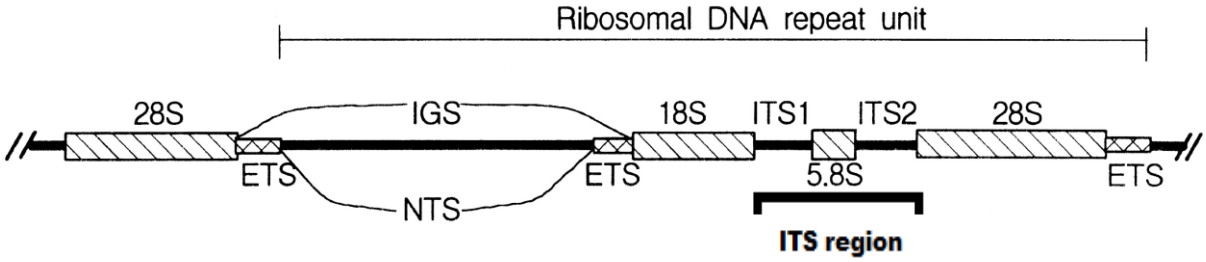
توجد مورثات الرنا الريبوزومي، عند حقيقيات النواة، على هيئة وحدات نوكليوتيدية متكررة ومتعاقبة على طول DNA في المناطق المنظمة للنويّة Nucleolus organizer regions (NORs). تحتوي كل وحدة على ثلاث مورثات تصنف حسب الوزن الترسيبي بوحدة سيفدبيرغ Svedberg unit (S) هي:

1- مورثة 28S rRNA؛ تحت الوحدة الكبيرة large subunit LSU، يبلغ طولها نحو 5000 bp.

2- مورثة 18S rRNA؛ تحت الوحدة الصغيرة small subunit SSU، يبلغ طولها نحو 2000 bp.

3- مورثة RNA الريبوزومي 5.8S rRNA يبلغ طولها نحو 160 bp.

تفصل بين هذه المورثات ضمن الوحدة الواحدة منطقتَي حيز استنساخي داخلي هما (ITS1 و ITS2)، وتفصل بين كل وحدتين من rDNA منطقة تسمى الحيز بين المورثي Intergenic spacer (IGS) (الشكل 3) (Dixon & Hillis، 1991)، التي تتألف بدورها من منطقة الحيز غير المنسوخ non-transcribed spacer (NTS) تطوّقها منطقتا الحيز الاستنساخي الخارجي External transcribed spacer (ETS) (Kent، وآخرون، 2009).



الشكل 3. رسم تخطيطي لوحدةrDNA عند حقيقيات النواة (Hwang & Kim، 1999)

إجمالاً، لا يسمح تحليل تسلسل الحمض النووي الريبي بإلقاء نظرةٍ ثاقبة على تطور الطحالب الخضراء فحسب، بل قد يحل أيضاً العديد من المشكلات التصنيفية حتى على مستوى الجنس (Sogin & Huss، 1990). على الرغم من أن مقارنة تتابعات مورثات rDNA ؛ كمورثات إشارية للتطور، قد أشارت إلى وجود تباين جزيئي عالٍ ضمن الأنواع المفردة المصنّفة اعتماداً على الأنماط الشكلية morphotypes (Sigee & Bellinger، 2015، ص: 78)، لأن التعبير المورثي يعتمد على الظروف البيئية النوعية التي تعيش فيها الطحالب، ولا يمكن ترجمة تعقيد أشكال الطحالب وتحوراتها إلى شيفرة الدنا DNA ببساطة (Slapeta، وآخرون، 2005؛ Sluys، 2013).

وحدة الرنا الريبوزومي الصغيرة 18S rDNA

استندت العلاقات التطورية داخل الطحالب الخضراء على نحو أساسي إلى تحليلات تتابع SSU rDNA المشفر نووياً (Leliaert & Pröschold، 2007)، إذ إن تتابع هذه المنطقة عالي الجودة يكشف تقريباً التقارب على مستوى الفصيلة، وعلى الأرجح على مستوى الجنس (Fawley & Fawley، 2021)، وتظهر نتائج جيدة على مستوى الأنواع (Dapra، 2016). وهي منطقة محفوظة بشكل كبير، باستثناء عدد قليل من المناطق شديدة التباين التي يمكن أن تكوّن شفرة التعريف barcode المحتملة، وهو المورث الوحيد الذي يحتوي على مجموعة بيانات واسعة النطاق من أجل الطحالب الخضراء، فهو الأكثر ملاءمة لمقاربة التعريف (Zimmermann، وآخرون، 2011؛ Stancheva، وآخرون، 2013)، فوجود المناطق المحفوظة يسهل تصميم المرئسات العامة، ووجود المناطق المتغيرة يسمح بإجراء الدراسة التطورية (Manoylov، 2014).

وعليه، يمكن تقصّي السلالات غير المعروفة أو تلك التي تفتقر إلى التعريف الجزيئي بأقل جهد ممكن عن طريق السلسلة المباشرة لجزء قصير من المنطقة 18S rRNA (Görs، وآخرون، 2009).

1.3 القيمة الغذائية للطحالب

تُعرف الطحالب عموماً بما فيها الطحلب *C. vulgaris* بمحتواها من المركبات التي يمكن أن تعود بفوائد أساسية على رُفَهنِية الإنسان (Raja، وآخرون، 2019)، وكما هو الحال مع أي نبات، فإن التركيب الكيميائي ليس ثابتًا ويختلف على نطاق واسع باختلاف عوامل البيئة. يقدّم الجدول 1 التركيب الكيميائي الإجمالي لبعض الطحالب ومقارنته بتركيب المواد الغذائية التقليدية.

الجدول 1. التركيب الكيميائي لبعض أنواع الطحالب الدقيقة والأغذية التقليدية كنسبة مئوية من الوزن الجاف.

النوع	البروتينات	الكربوهيدرات	الليبيدات
Scenedesmus obliquus	50 – 56	10 - 17	12 - 14
Scenedesmus dimorphus	8 – 18	21 - 52	16 - 40
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	49–55	7–42	3–36
Chlorella pyrenoidosa	57	26	2
Haematococcus pluvialis	48	27	15
Dunaliella salina	57	32	6
Spirulina platensis	53–70	12–24	6–20
Spirulina maxima	60 – 71	13 - 16	6 - 7
خميرة الخباز	39	38	1
اللحوم	43	1	34
الحليب	26	38	28
البيض	47	4	41
الرز	8	77	2
فول الصويا	37	30	20

(Lucakova، وآخرون، 2022؛ Becker، 2007؛ Gouveia، وآخرون، 2008)

برز الاهتمام الكبير بالطحالب الدقيقة عموماً كبروتين مفرد الخلية (Single cell Protein: SCP) خلال الخمسينات من القرن الماضي (Safi، وآخرون، 2014)، إذ تراوح محتوى البروتين الكلي في خلايا *C. vulgaris* بين 21.18% و43.13% من الوزن الجاف للكتلة الحيوية (عكّو وآخرون، 2017)، وبين 42–58٪ عند Seyfabadi وزملائه (2011) وفقاً لظروف النمو، وأعطت بصمة الحموض الأمينية نموذجاً يقارن بالبروتينات الغذائية الأخرى والنموذج المرجعي للبروتين المتوازن الذي تقترحه منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الأغذية والزراعة (FAO)؛ الجدول 2، بما فيها من حموض أمينية أساسية (Guil-Guerrero وآخرون، 2004؛ Wells، وآخرون، 2017)، إذ تحتوي البروتينات المشتقة من الطحالب الدقيقة على كامل الحموض الأمينية الأساسية (EAA) (Matos، وآخرون، 2017؛ Martínez–Hernández، وآخرون، 2018)، فهي توازي البروتينات النباتية في جودتها وتتفوق عليها أحياناً، بل يُحتمل أن يكون محتوى البروتين في الطحالب أعلى منه في المصادر التقليدية مثل اللحوم والدواجن ومنتجات الألبان (Gouveia، وآخرون، 2007؛ Koyande، وآخرون،

2019)، وبالإمكان استبدالها عن البروتين الحيواني جزئياً في النظام الغذائي (Jeon، وآخرون، 2014؛ Jung، وآخرون، 2016).

بل أكثر من ذلك، يمكن أن تكون مضافاً أو بديلاً بروتينياً مناسباً عن المنتجات الحيوانية في مجموعات دينية مختلفة أو أنظمة غذائية متخصصة، مثل النظام الغذائي النباتي اللبني lacto-vegetarian diet عند الهندوس (Watanabe، وآخرون، 2014؛ Machu، وآخرون، 2015)؛ الأمر الذي أدى إلى تسارع نمو قطاع استخدام بروتين الطحالب الدقيقة في المنتجات الغذائية في سوق الأغذية الوظيفية. ناهيك عن أن ميزة استخدام بروتين الطحالب بالكامل في أنه محمي داخل الخلية ولا يتأثر بالتغيرات في درجة الحموضة، وهذه الخاصية لها آثار كبيرة عند تدعيم المنتجات في درجة حموضة منخفضة، إذ يلزم عادة استخدام مثبتات لمنع ترسيب البروتين (Mooney & Klamczynska، 2017).

الجدول 2. مقارنة محتوى البروتين من الحموض الأمينية للنوع *C. vulgaris* وغيره من المصادر الغذائية، والنموذج المرجعي للبروتين المتوازن الذي تقترحه منظمة الصحة العالمية WHO والأغذية والزراعة FAO (g في 100g بروتين).

Ser	Pro	His	Gly	Glu	Asp	Arg	Ala	Thr	Try	Cys	Met	Tyr	Phe	Lys	Val	Leu	Ile	
									1		3.5		6	5.5	5	7	4	WHO/FAO
6.9	4.2	2.4	4.2	12.6	11	6.2		5	1.7	2.3	3.2	4.2	5.8	5.3	7.2	8.8	6.6	بيض
5.8	5.3	2.6	4.5	19	1.3	7.4	5	4	1.4	1.9	1.3	3.7	5	6.4	5.3	7.7	5.3	فول الصويا
4.1	4.8	2	5.8	11.6	9	6.4	7.9	4.8	2.1	1.4	2.2	3.4	5	8.4	5.5	8.8	3.8	*Chlorella vulgaris*

(Becker، 2007)

أما فيما يتعلق بالمحتوى المعدني، فإن المراجع التي تصف هذا المحتوى في الطحالب قليلة (Islam، وآخرون، 2018)، كما أن تلك التي تتناول المعادن في أطعمة الطحالب هي قليلة نسبياً أيضاً (Cabrita وآخرون، 2016) مقارنة بتلك التي تصفه في كتلة الطحالب نفسها؛ الدقيقة والخضراء، حتى في النوع المدروس (الجدول 3)، بداعي أهميتها لإمكان استغلال هذه الكتلة في إنتاج الوقود.

الجدول 3. تركيز بعض المعادن في كل من الكتلة الجافة للطحلب *C.vulgaris* وفي الطحالب الدقيقة والخضراء منها.

العناصر المعدنية	تركيز العناصر المعدنية (ppm) في الكتلة الحيوية الجافة للطحالب		
	الطحلب *C.vulgaris* *	طحالب خضراء دقيقة**	طحالب دقيقة عموماً**
P	77.26289 – 6449.39	67000	90000 – 6200
K	9364.76 – 4545.87	120000	160000 – 1400
Fe	2510.21 – 1724.43	3300	4400 – 370
Cu	62.87 – 18.53	62	120 – 11
Mn	93.16 – 38.61	850	1200 – 14

***: (عكو وآخرون، 2017)؛ **: (Bi وHe، 2013)**

لا يحتوي رماد الطحالب الدقيقة على العناصر المعدنية المغذية مثل البوتاسيوم والحديد والمغنزيوم والكالسيوم واليود فقط (Becker، 2013؛ Martínez–Hernández، وآخرون، 2018)، بل إنها تبلغ مستوىً أعلى نسبياً مما هو عليه في النباتات الراقية (Wang وآخرون، 2012)، ومن هنا تبرز أهميتها في سدها للحاجة اليومية من بعض العناصر المعدنية (Kai Ru، وآخرون، 2020) (الجدول 4)، فالعناصر المعدنية تتميز بدور وظيفي مهم في الجسم، ولابد من توفرها في الغذاء اليومي، لتؤدي دورها، بكميات حددتها منظمة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Administration (FDA) (2019)، وبناءً على ذلك لا يزال يعاني أكثر من نصف سكان العالم من عوز المعادن، خاصة في البلدان النامية التي تعتمد أساساً على الحبوب (Jorge، وآخرون، 2008)، كما يعاني نحو ثلث النساء حول العالم (29.9%) و(39.8%) من الأطفال دون سن الخامسة من فقر الدم (WHO، 2022)، الذي يمكن أن ينجم عن نقص الحديد؛ الأمر الذي يؤثر سلباً في التطور المعرفي والمناعة والخصوبة (Gupta، وآخرون، 2015)، ولذا يمكن لتعزيز الغذاء بالمعادن أن يساعد في رفع مستوى التغذية. حيث تبين أن أقل من 100g من الكتلة الحيوية الجافة للنوع *C .vulgaris* يمكن أن تغطي معظم الحاجة اليومية من بعض المعادن مقارنة بتوصيات FDA (الجدول 4) (عكّو وآخرون، 2017).

الجدول 4. الاحتياج اليومي للإنسان من بعض المعادن حسب (FDA، 2019)، وتركيزها في النوع *C. vulgaris*

العناصر المعدنية	الحاجة اليومية من العناصر المعدنية*/mg	النسبة المئوية لما يغطيه 100g طحلب كمادة جافة من الاحتياج اليومي للمعادن
P	1000	124
K	3500	18
Ca	1000	136
Na	2400	3
Fe	18	1204
Zn	15	244
Cu	2	162
Mn	2	274

(عكّو وآخرون، 2017).

*: القيم اليومية هي الكميات الموصى بها يوميًا للأمريكيين البالغ أعمارهم 4 سنوات أو أكثر.

من جهة ثانية، فإن المحتوى الكلي من الليبيدات هو أحد المؤشرات المهمة لتحديد القدرة الإنتاجية للطحالب، إذ يمكن أن تصل نسبة الليبيدات في الكتلة الحيوية الجافة للنوع *C.vulgaris* ضمن ظروف النمو المثالية 13.62% (عكّو وآخرون، 2017)، وتكوّن الحموض الدهنية المشبعة المحتوى الأكبر من ليبيدات هذا النوع نسبة لا تزيد على 60% (He & Bi، 2013؛ عكّو وآخرون، 2017)، ولوحظ أيضاً وجود الحمضين C15:0، C17:0 (عكّو وآخرون، 2017) اللذين يندر وجودهما في ليبيدات الزيوت النباتية وفق ما ذكره Bi وHe (2013).

أما عن الحموض الدهنية طويلة السلسلة عديدة عدم الإشباع (أكثر من 18 ذرة كربون) LC-PUFA، وحدها الطحالب مع النباتات الراقية من يزود سلاسل الغذاء كافة بهذه الحموض (Gross & Pulz، 2004)، فحموض أوميغا 3 الدهنية Omega-3 مثل حمض إيكوسابنتاينويك eicosapentaenoic acid (EPA) وحمض دوكوساهكسانويك docosahexaenoic acid (DHA) التي تُباع كزيت سمك للاستهلاك البشري مصدرها ما تتغذى الأسماك عليه من الطحالب (Raja، وآخرون، 2018)، لهذا توفر الطحالب الدقيقة بديلاً لزيت السمك الذي كان يُدرج في الأعلاف المائية. وحيث إن نقص الحموض LC-PUFA في الغذاء على وثيق صلةٍ بزيادة نسبة المرض والوفاة الناجمة عن مرض القلب التاجي، يمكن للطحالب الدقيقة أن تكون واعدة في صناعة الأغذية وتقديمها كبديل

لزيوت الأسماك (Bandarra، وآخرون، 2003؛ Donato، وآخرون، 2003) ذات الطعم غير المحبب والثباتية الضعيفة ضد التأكسد poor oxidative stability (Luiten، وآخرون، 2003).

من ناحية الكربوهيدرات، يمكن أن تتراوح قيمتها الإجمالية للكلوريلا *C. vulgaris* بين 21–40% من الوزن الجاف (عكو وآخرون، 2017). وقد اكتسب المحفِّز المناعي النَّشط β–1، 3–غلوكان؛ أحد أهم السكريات الموجودة في *C. vulgaris*، شعبية في السنوات الأخيرة بسبب خصائصه الغذائية والعلاجية في تعزيز صحة الجسم، مثل إزالة الجذور الحرة وتقليل نسبة الدهون في الدم (Safi، وآخرون، 2014؛ Koyande، وآخرون، 2019). تُظهر عديدات السكاريد في *C. vulgaris* أيضاً تأثيرات أخرى مضادة للأورام وللفيروسات، والتعديل المناعي القوي؛ مما يشير إلى إمكان استغلالها في تطوير عقاقير مضادة للسرطان (Guedes، وآخرون، 2013؛ Balaji، وآخرون، 2017).

لا يساعد تناول كميات صغيرة من الكتلة الحيوية للطحالب الدقيقة في الحصول على الليبيدات والبروتينات النوعية والمعادن الغذائية فقط بل يمكن لفيتامينات الطحالب الدقيقة أن تعزز القيمة الغذائية لخلايا الطحالب إذا ما استُخدمت كمكمل غذائي (Andrade، وآخرون، 2018). ومع ذلك، من المهم ملاحظة أن هذا المحتوى من الفيتامينات يتغير إلى حدّ كبير مع ظروف التنمية البيئية، واستراتيجية الحصاد وطريقة تجفيف الخلايا (Brown، وآخرون، 1999). فالطحالب الدقيقة مصدر غير مستكشف بعد لجميع الفيتامينات تقريباً (Martínez–Hernández، وآخرون، 2018؛ Galasso، وآخرون، 2019).

وبصورة أكثر تفصيلاً، تركّب العديد من الطحالب الدقيقة الفيتامين E (Loh & Bong، 2013؛ Santiago-Morales، وآخرون، 2018) لذا يمكن أن تكون مصدراً قيماً لهذا الفيتامين في المكملات الغذائية، حتى إن محتواها يمكن أن يكون أعلى منه في النباتات الأرضية (Zolotareva & Mokronsnop، 2014)، كما يمكن أن يحتوي بعضها على الفيتامين A بنسبة تزيد عما هي عليه في زيت كبد السمك (De Roeck-Holtzhauer وآخرون، 1991)، حتى أن احتواءها على الفيتامينات D_2 و/ أو D_3 جنباً إلى جنب مع طليعة الفيتامين D_3، يفسِّر غنى الأسماك بهذا الفيتامين (Jakobsen & Jäpelt، 2013)، ويحتوي الطحلب *C. vulgaris* على كميات من

بروفيتامين D_2 الإرغوستيرول (Wu، وآخرون، 2017)، والفيتامين D بكميات تقارب تلك في الفطريات الزراعية (Bito، وآخرون، 2020)، خلافاً للنباتات التي لا تنتج كلا شكلي الفيتامين D عند البشر؛ D_2 وD_3 (Bito، وآخرون، 2020)، ويمكن لها أن تراكم تراكيز عالية من الفيتامين C (Brown، وآخرون، 1999).

إن الطحلب *Chlorella* spp. يحتوي على الفيتامين B_7 (البيوتين) بتركيز عالٍ (Koyande، وآخرون، 2019). يحتوي النوع *C. vulgaris* على مجموعة مهمة من الفيتامينات (الجدول 5)؛ مما يشجع استغلالها تجارياً سواء في الغذاء أو مستحضرات العناية بالبشرة (Salvia، وآخرون، 2014؛ Mehariya، وآخرون، 2021) أو كمكملات غذائية (Bito، وآخرون، 2020).

الجدول 5. محتوى الفيتامينات في الطحلب *Chlorella* لكل 100 غرام كتلة حيوية جافة.

الفيتامين	تركيز الفيتامين mg
Vitamin A	30.77
Vitamin C	10.4
Thiamin (vitamin B_1)	1.7
Riboflavin (vitamin B_2)	4.3
Niacin (vitamin B_3)	23.8
Pantothenic acid (vitamin B_5)	1.1
Pyridoxine (vitamin B_6)	1.4
Folate (vitamin B_9)	94 µg
Cobalamin (vitamin B_{12})	0.1 ug
α-tocopherol (Vitamin E)	1.5
Phylloquinone (Vitamin K)	-

(Andrade، وآخرون، 2018)

يحتوي الطحلب *C. vulgaris* على تراكيز عالية من حمض الفوليك تصل حتى 2.45 ملغ/100 غ من الوزن الجاف، كما أنه يحتوي على مركبات الفولات الرئيسة الأخرى أيضاً (Woortman، وآخرون، 2020).

وخلافا للحال عند النباتات، يمكن لبعض الطحالب الدقيقة تركيب الفيتامين B_{12} أو احتوائه (Croft، وآخرون، 2005). وبكميات تُقارن بتلك في الأطعمة الحيوانية (Takenaka، وآخرون، 2001)، فضلاً عن ذلك فهي تتمتع بتوافر حيوي لهذا الفيتامين (Kumudha، وآخرون، 2002؛ Watanabe، وآخرون، 2015)، على عكس أنواع السبيرولينا *Spirulina* sp. (Dagnelie، وآخرون، 1991)؛ مما يقدّم لاستنتاج أن الأطعمة المشتقة

من الطحالب الدقيقة توفر مصدراً أساسياً لفيتامين B_{12} للأفراد الذين يتبعون الأنظمة الغذائية النباتية (Koyande، وآخرون، 2019)، وتقدم أحد البدائل النباتية القليلة لفيتامين B_{12} في النظام الغذائي (Wells، وآخرون، 2017).

إضافة إلى غنى النوع *C. vulgaris* بالبروتين والدهون والفيتامينات والمعادن، فهو أيضاً غني بمضادات التأكسد والمركبات الفينولية والكاروتينات (Machu، وآخرون، 2015؛ Coulombier، وآخرون، 2021)، التي بدأ الاهتمام بها ودراستها منذ عام 1996 (Yang، وآخرون، 2023)، فقد أدت مكملات *Chlorella vulgaris* إلى تحسين إنتاجية الأرانب من خلال تخفيف الإجهاد التأكسدي وتعزيز أنشطة إنزيمات مضادات التأكسد وتنظيم الجينات الأولية المضادة للتأكسد (Sikiru، وآخرون، 2019). وأظهرت المستخلصات الخام بالميتانول للنوع *C. vulgaris*، نشاطاً مضاداً للتأكسد يقارب لما يظهره كل من المركب الطبيعي الفيتامين C وذاك الصنعي BHT (Butylated Hydroxytoluene) (El-fayoumy، وآخرون، 2021)، وخلافاً لذلك، كان المستخلص المائي للنوع ذاته أقل نشاطاً حافظاً من الفيتامين C (Habashya، وآخرون، 2018)، وقد كشف التحليل الكيميائي لعدة مستخلصات من الطحلب *C. vulgaris* وجود قلويدات وفلافونيدات وفينولات أظهرت نشاطاً مضاداً للتأكسد (Abdel-Karim، وآخرون، 2020).

إن غنى الطحلب *Chlorella vulgaris* بمضادات التأكسد شجّع تقديمه في المكملات الغذائية ليكون وسيطًا فعالًا في إزالة الجذور الحرة (Abdel-Karim، وآخرون، 2020)، علاوة على أنه يمكن لمضادات التأكسد الطبيعية أن تزيد من مدة صلاحية الأغذية. لذا، فإن استهلاك مضادات التأكسد وإضافة مضادات التأكسد إلى المواد الغذائية لا يحمي الجسم فقط بل الغذاء كذلك (Carocho، وآخرون، 2018؛ Lourenco، وآخرون، 2019). وهنا لابد من الإشارة إلى وجود فجوة معرفية كبيرة حول فعالية الخصائص المضادة للتأكسد لمنتجات الطحالب الدقيقة في الأغذية على جميع المستويات؛ بدءاً من تحديدها فيما بين الأنواع ومروراً بتأثيرها في مجموع الأحياء الدقيقة المعوية microbiome وعبورها التجويف المعوي وانتهاءً بتأثيرها في الوظائف الحيوية للجسم (Wells، وآخرون، 2017)، ومن المتوقع أن تبقى الأبحاث حول النشاط الحيوي المضاد للتأكسد للطحالب الدقيقة موضوعاً بحثياً ساخناً في المستقبل (Yang، وآخرون، 2023).

1.4 التدعيم الغذائي

في السنوات الأخيرة، كشفت الأبحاث الأكاديمية وتقارير الأسواق عن زيادة وعي المستهلكين واهتمامهم بالأطعمة الصحية والوظيفية (Lähteenmäki & Urala ، 2003)، تحت تأثير ثلاثة عوامل هي:

(1) الاعتراف بدور الغذاء في الحفاظ على الصحة (Krystallis، وآخرون، 2008).

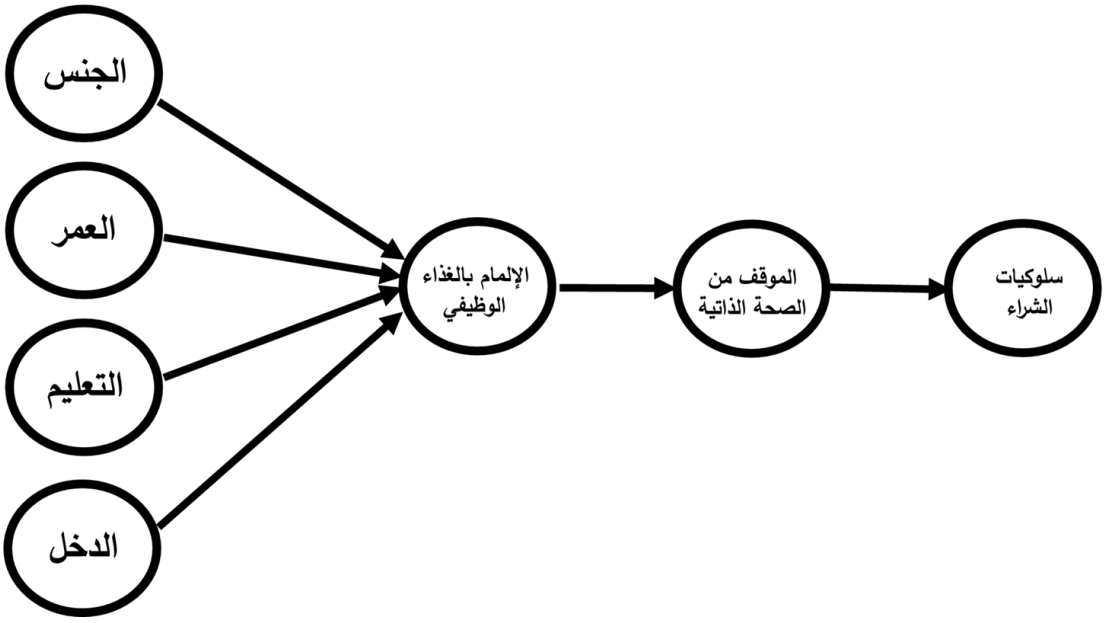
(2) زيادة متوسط العمر المتوقع (Menrad، 2003).

(3) زيادة تكاليف الرعاية الصحية (Menrad، 2003).

في العقدين الماضيين، قامت العديد من الدراسات بتقييم وعي المستهلك لعدد من المنتجات الغذائية الصحية ودرجة تفضيله لها وموقفه منها وإدراكه الحسي perception لمواصفاتها ونيته لشرائها، على الرغم من صعوبة شرح السلوك البشري في اختيار الطعام (Büyükkaragöz، وآخرون، 2014؛ Vecchio، وآخرون، 2016)، وتغدو استجابة الإنسان للمواد الغذائية أكثر وعياً، مع التقدم بالعمر وارتفاع مستوى التعليم (Büyükkaragöz، وآخرون، 2014؛ Bimbo، وآخرون، 2017). ويستهلك الأشخاص من الفئات الاجتماعية والسكانية الأعلى مستوىً الغذاء الأكثر صحة إذ لديهم معرفة تغذوية أفضل (Ryan & Bogue، 2000)، وبينما لم توجد أي علاقة ذات دلالة إحصائية بين السلوك الغذائي الصحي وأيّ من الحالة الاجتماعية أو حجم الأسرة أو عدد الأطفال (Ryan & Bogue، 2000)، فقد كانت إيجابية مع الإناث (Büyükkaragöz، وآخرون، 2014؛ Bimbo، وآخرون، 2017) ولاسيما ممن هُنَّ فوق سن 35 عاماً (Ryan & Bogue، 2000).

وهنا تجدر الإشارة إلى ما ذكره Roberfroid (2002) خلافاً لذلك عن ميل المستهلكين الأُول للمنتجات الغذائية الصحية لأن يكونوا ممن لديهم الوعي بالصحة من صغار السن عموماً. ولكن من غير المحتمل أن يكون ميلهم هذا بغرض الوقاية من الأمراض، بل هو ناتج جزئياً عن تأثرهم بوسائل التواصل الاجتماعي كون هذه المنتجات 'طبيعية nutural' (Bimbo، وآخرون، 2017؛ Puhakka، وآخرون، 2017)، والتي تتمتع عموماً بأعلى مستوى من القبول بين المستهلكين كافة (Bimbo، وآخرون، 2017).

لقد تم اشتقاق نموذج model مرجعي للعلاقة بين هذه العوامل وسلوك المستهلك (الشكل 4) (Sääksjärvi، وآخرون، 2009). يفترض هذا النموذج، بما يثير الاهتمام، أن الجنس والعمر والدخل والوضع الاجتماعي والثقافي هي المؤثرات المباشرة في مستوى معرفة المستهلك بالأغذية الصحية، ليغدو بعد ذلك سلوك شراء هذه الأغذية نتيجة لتلك المعرفة، ويأتي الاهتمام برفاهة الفرد ليعمل كوسيط بين المعرفة والشراء (Sääksjärvi، وآخرون، 2009).



الشكل 4. نموذج مرجعي للعلاقة بين العوامل المؤثرة في سلوك المستهلك (Sääksjärvi، وآخرون، 2009) معرفة المستهلكين بالأغذية الوظيفية: السوابق والعواقب.

تُعدّ معرفة المستهلك للادعاءات الصحية health claims أحد العوامل الدافعة له لاستهلاك الغذاء الصحي (Matulich & Moorman، 1993)، فهي لا تؤثر بالضرورة في مقدار إعجاب الناس بالمنتج ولكنها مرتبطة بكمية استهلاكهم له (Wansink، وآخرون، 2005). ولابد من الإشارة إلى أن زيادة الاستهلاك ارتبطت بمعرفة السمات المميزة للغذاء جنباً إلى جنب مع معرفة نتائج استهلاكه وكيفية الاستفادة منه؛ أي بالمعرفة التغذوية الشاملة (Wansink، وآخرون، 2005). وعليه، قد لا تشجع الاستراتيجيات التي تعتمد نشر جانب واحد من المعرفة فقط على استهلاك هذه الأغذية بفعالية؛ مما يوجب على اختصاصيي التغذية والرعاية الصحية ربط سمات الأغذية بالنتائج الصحية الشخصية عند التواصل مع المرضى (Wansink، وآخرون، 2005)، أي إن توفير معلومات

إضافية للمستهلك من خلال الادعات الصحية يزيد من القيمة الملموسة للمنتج (Hailu، وآخرون، 2009؛ Vecchio، وآخرون، 2016)، كما أن إدراك الفوائد الصحية للمكون الصحي يزيد الإعجاب بالمنتج الذي يحتويه، ويزيد احتمالية شرائه (Urala، 2005؛ Van Kleef، وآخرون، 2005). وعليه، لم يعد تطوير المنتجات الغذائية وإدخال مكونات طبيعية جديدة ترفع قيمتها الغذائية وحده كافياً، بل لابد من تطوير الادعاءات العلمية للمنتجات الجديدة والحالية لمصلحة كل من صحة الإنسان وصناعة الأغذية (Roberfroid، 2002).

1.4.1 استخدام الطحالب في الغذاء

توجد الطحالب الدقيقة في الأسواق كمنتجات تجارية؛ على هيئة مكمل أو مضاف غذائي (Martínez–Hernández، وآخرون، 2018؛ Fradique، وآخرون، 2010)، أو ملوّن آمن أو عامل استحلاب (Fernandes، وآخرون، 2012)، وفي الآونة الأخيرة، أُدخلت هذه الأحياء الدقيقة بنجاح في المخبوزات؛ الخبز والبسكويت والكعك المحلى والكعك، لتعزيز المحتوى النشط حيوياً والبروتين (Matos، وآخرون، 2017؛ Hossain، وآخرون، 2017؛ Batista، وآخرون، 2017؛ Graça، وآخرون، 2018)، فالطحالب عموماً خفيفة النكهة ويمكن إضافتها إلى الأطعمة (Barton & Kay، 1991)، وقد انطوى دمج الكتلة الحيوية للطحلب كاملاً في المنتجات الغذائية على تحديات تقانية تتعلق مثلاً بالمواصفات الحسية المقبولة ومعالجتها لتمكين هذه المنتجات المستقبلية من أن تصبح سائدة في السوق الأوسع (Bonwick & Birch، 2018)، في الوقت الذي أكدت فيه العديد من الدراسات أن المنتجات مع طحلب *C. vulgaris* مثل المعكرونة (Fradique، وآخرون، 2010) أو البسكويت (Batista، وآخرون، 2017؛ Gouveia، وآخرون، 2007؛ Batista، وآخرون، 2017) أو اللبن (Beheshtipour، وآخرون، 2012؛ Beheshtipour، وآخرون، 2013) أو المايونيز (Mohamed & Abd El-Razik، 2013) قد حظيت بالتقدير عموماً.

إن إضافة الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* إلى أشباه الجبن، دعمت محتوى البروتين والكربوهيدرات والألياف فيها، وغدا القوام أكثر ثباتاً والخثرة أقل فصلاً للزيت، وكان مقبولاً حسياً (Mohamed، وآخرون، 2013). وفي ذات السياق، عززت إضافة هذا الطحلب القيمة الغذائية والمواصفات الحسية للباستا دونما تأثير في القوام

وخصائص الطبخ (Fradique، وآخرون، 2010)، وأدت إضافة الطحلب *C. vulgaris* إلى دقيق القمح بنسبة تصل حتى 3% إلى تعديل الخصائص الريولوجية لعجينة الخبز، وتقوية شبكة الغلوتين، وزيادة القدرة على الاحتفاظ بالماء، دونما إحداث أي أثر في حركية التخمّر، ولا في الوقت المطلوب للتخمير، مع أثر إيجابي في قوام الخبز وشكله (Graça، وآخرون، 2018)، وعند تشكيل الخبز في أصابع، احتوى المنتج النهائي على نسبة عالية من الأصبغة (الكاروتينات الكلية واليخضور) مقارنة بالشاهد، علماً أنه لم يحتوِ على الفيتامين C مع احتواء خلايا الطحلب له (Igual، وآخرون، 2021). وفي ذات السياق، أدت إضافة كتلة الطحلب *C. vulgaris* إلى العجين (بالنسب 0.5، 1، 1.5، 2%) إلى تحسين طباعة البسكويت بالطابعة ثلاثية الأبعاد من خلال الحفاظ على أبعاد قطع البسكويت وتحقيق البنية ثلاثية الأبعاد الأكثر ثباتاً ومقاومة للخَبز، فضلاً عن تلوينها (Uribe-Wandurraga، وآخرون، 2021). وكان للإضافة حتى 3% تأثيراً إيجابيا في القوام واللون (Gouveia، وآخرون، 2007)، أظهر البسكويت مع *C. vulgaris* بنسبة 6% طعماً بحرياً قوياً استمر بعد التذوق؛ مما أثر سلباً في تقييمه حسياً (Batista، وآخرون، 2017).

وبالنظر إلى أن المكونات الغذائية ذات القدرة العالية على الاحتفاظ بالماء water holding capacity WHC مرغوب فيها لتوفير السماكة واللزوجة للأطعمة ذات اللزوجة؛ مثل الحساء (شوربة بروكولي) والمرق (الصلصات) والكعك والمعجنات (المخبوزات) وما إلى ذلك (Oshodi، وآخرون، 1997؛ Lafarga، وآخرون، 2019؛ Acquah، وآخرون، 2021)، فإن إضافة الكتلة الحيوية الطحلبية إلى هذه الأطعمة لا تعطيها اللون والنكهة فقط بل توفر لها السماكة واللزوجة أيضاً، بسبب امتصاصيتها العالية للماء ونمو خلايا الطحلب معلقة في المحيط المائي وعدم ذوبانها فيه (Lafarga، وآخرون، 2019).

خلافاً لسلوك خلايا الطحلب الكاملة، فإن بروتين الطحلب الكامل المُنمّى بالطريقة غير المتجانسة heterotrophica يُظهر امتصاصاً منخفضاً للماء وتفاعلاً قليلاً مع مكونات الغذاء الأخرى، فعند إضافته إلى وصفة رقائق البسكويت crackers حتى نسبة 20% لتحل جزئياً محل دقيق القمح، لم يؤثر في الريولوجيا (انسيابية

العجين وقابليته للمد وتشكيل الرقائق sheetability) وقلل الميل إلى التصلب بمرور الوقت، كما أدى إلى مضاعفة محتوى البروتين في الرقائق في ذات الوقت (Klamczynska، وآخرون، 2017) ص335.

أثبتت الدراسات أن الطحلب المدروس مفيد فهو مادة أصلية للحصول على مركبات نشطة حيوياً مختلفة (Syed، وآخرون، 2015؛ Ramos-Romero، وآخرون، 2021؛ Perkovi´c، وآخرون، 2022). ولما كانت الجزيئات النشطة حيوياً في الطحالب مقاومة لمختلف عمليات النقل transfer الحرارية، في مختلف الأطعمة، كانت الطحالب بمقام أنظمة توصيل مغذّية nutraceutical delivery systems (Gouveia، وآخرون، 2008). وبالرغم من ذلك، لا يزال هناك فجوة معرفية حول استخدامات الطحالب الدقيقة كمكون غذائي وظيفي (Raja، وآخرون، 2018)، والطحلب *C. vulgaris* مع انتشاره الواسع في السوق التجارية فإنه لا يزال يُستخدم بسبب خصائصه كملوِّن في المقام الأول أكثر منه مصدراً للعناصر الغذائية كمدعِّم (Lucakova، وآخرون، 2022).

1.4.2 تدعيم الوجبات الخفيفة – البسكويت

عند الحديث عن الوجبات الخفيفة الصحية يتم تجاهل كبار السن؛ وهم ممن يمكن لهم كبير الاستفادة من الغذاء المدعّم الصحي، إذ يعد نقص التغذية سمة مشتركة لديهم، ولا سيما أولئك الذين يتلقون العلاج في المستشفيات بنسبة 44٪ منهم تقريباً على مستوى العالم (Mills، وآخرون، 2018)، مما يؤدي إلى طول فترة التعافي وربما المزيد من تدهور الحالة الصحية (Bonwick & Birch، 2018)؛ الأمر الذي يستلزم استراتيجيات معقدة لتحسين حالتهم التغذوية (Mills، وآخرون، 2018)، وتتمثل إحدى الحيل المقترحة في تأمين وجبات خفيفة غنية بالطاقة أو الخبز والبسكويت المدعّم بالبروتين في تخفيف الشهية الضعيفة، إذ يتعرض كبار السن أيضاً لانخفاض تدريجي في حساسية التذوق والشهية بسبب التغيرات الفيزيولوجية مع العمر (Boesveldt، وآخرون، 2018).

غالباً، لا تقتصر حالات الاختلال الوظيفي في حاستي التذوق والشم، على كبار السن، بل إن العلاج الكيميائي للسرطان (Boesveldt، وآخرون، 2018)، ومرض الزهايمر (Sergi، وآخرون، 2017؛ Boesveldt، وآخرون، 2018)، ومرض الجيوب الأنفية وفقدان الشم (Whitcroft، وآخرون، 2017)، يمكن أن يؤدي إلى ضعف الشهية واحتمال سوء التغذية. علاوة على ذلك، يمكن لمرضى الدنف (الهُزال) cachexia المرتبط بالسرطان

(Crawford، 2018؛ Baracos، وآخرون، 2018)، أن يستفيدوا إلى حدٍّ كبير من تطوير منتجات غذائية صحية غنية بالمغذيات ذات خصائص ناعمة الملمس (Bonwick & Birch، 2018).

من بين جميع المنتجات الغذائية، لا تزال شعبية البسكويت، كوجبة خفيفة، مستمرة في النمو على نطاق عالمي، حيث يبحث المستهلك عن وجبات خفيفة تماشي أسلوب حياته (Bonwick & Birch، 2018)، وتضمن له تناول المغذيات برغم إغفال أوقات الوجبات التقليدية خلال سعيه لاستغلال الوقت بكفاءة (Slavin & Hess، 2017). يمكن تناول البسكويت بمتعة وسلاسة ودون أي إزعاج في جميع الأوقات والأماكن، ويسهل حمله في الجيب دونما حاجة لشروط تخزين معينة (Norhayati، وآخرون، 2015؛ Uribe-Wandurraga، وآخرون، 2021). ويُقدّر استهلاك البسكويت نحو 40 عبوة لكل شخص سنوياً (Humphrey-Tay & Zydenbos، 2003).

يُضاف إلى ذلك أن إغناء البسكويت بالمعادن، وهو منتَج من الحبوب، سيكون بمنزلة وسيلة سهلة لتزويد الجسم بالعناصر المعدنية الغذائية، نظراً إلى التيسُّر الحيوي المحدود للمعادن في الحبوب، الذي لا يعود فقط لانخفاض مستوياتها نسبياً، وإنما لوجود حمض الفيتيك Phytic acid المخلبي أيضاً، حيث يرتبط بالمعادن فيقل تيسرها للكائنات أحادية المعدة كالإنسان (Thrane، وآخرون، 2017، ص: 38)، ويمكن لهذا الحمض أن يخفض التيسر الحيوي للمعادن بنسبة 5–15٪؛ الأمر الذي يمثل تحدياً عند التغذية (Das، وآخرون، 2012)، لذا فإن خفض نسبة حمض الفيتيك أو زيادة نسب المعادن يرفع القيمة الغذائية لهذه الحبوب، فضلاً عن أن البسكويت من الوجبات الخفيفة المستهلكة يومياً على نطاق واسع، والمرغوب فيها عند جميع الفئات العمرية.

الفصل الثاني

مواد البحث وطرائقه

Materials and Methods

2. مواد البحث وطرائقه

تم الحصول على النوع *C. vulgaris* نقياً من مختبر تقانات الطحالب في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في مزرعة سائلة.

2.1 مكان تنفيذ الدراسة

نُفّذ البحث في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

2.2 التعريف الجزيئي للنوع *Chlorella vulgaris*

زُرع الطحلب من البيئة السائلة في أطباق بتري على بيئة صلبة تكونت من الوسط المغذي BBM _قد ذُكرت مكوناته في الفقرة المعنونة "تنمية الطحلب وإكثاره"_ مضافاً إليه الآغار بنسبة 1.5%، ثم تُركت الأطباق في حاضنة مضاءة ودرجة حرارة 26°C. أُعيدت عملية تلقيح أطباق آغار جديدة بمستعمرات من الأطباق المزروعة سابقاً حتى الحصول على مستعمرة نقية ناتجة من خلية واحدة فقط (Lloyd، وآخرون، 2021)، وُضعت هذه المستعمرة في دورق يحتوي وسطاً مغذياً BBM معقماً وتُركت في حاضنة هزّازة مضاءة عند درجة حرارة 25°C، وبعد اخضرار محتوى الدورق جرى تثفيله (13.000 g مدة 3 دقائق)، وأُخذ نحو 60 mg من الرسابة، التي هي خلايا الطحلب، لتجميدها بالآزوت السائل مباشرة، وطحنها في جهاز TissueLyser LT (Qiagen)، بعد ذلك استُخلص الدنا DNA من خلايا الطحلب باستخدام i-genomic Plant DNA Extraction Mini (iNtRON) Kit وفق تعليمات الشركة الصانعة.

قُدِّرت كمية الدنا DNA في العينة باستخدام المطيافية الضوئية Hitachi/ U-2900 Spectrophotometer، حيث أُخذت القراءة عند طول الموجة 260 نانومتراً (nm) لحساب تركيز الدنا DNA في العينة وفق المعادلة الآتية:

DNA con. (µg/µl) = {A260 x 100 (dilution factor) x 50 µg/ml}/1000

وتعطي نسبة قراءة الامتصاصية بين طول الموجتين 260 و280 نانومتراً تقييماً لنقاوة الدنا DNA، ويملك الدنا DNA النقي نسبة قراءات بين 1.7 إلى 1.9 (Sambrook، وآخرون، 1989).

جرى فحص نوعية الدنا DNA بترحيله في هلامة أغاروز بتركيز 0.8% مكوّنة من: 0.8 g أغاروز (Hi-Agarose, USA) و100 mL من المحلول المنظم TBE (90mM Tris: pH=8, 90mM Boric acid, 2mM EDTA)، سُـخّن المزيج حتى ذوبان الأغاروز، ثم بُرّد إلى درجة 65°C وأُضـيف إليه 5µl من الصـباغ Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology). تم الرحلان بجهـد 100 فولت مدة 30 دقيقة باستخدام 1X TBE محلولاً منظماً. بعدها، صُـوّرت الهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلامات Cleaver scientific LTD.

2.2.1 تضخيم المنطقة 18S rDNA في التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR

أُجري تفاعل PCR باستخدام شفع المرئسات الموضّحة في الجدول 6.

الجدول 6. التتابع النوكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تفاعل تضخيم المنطقة 18S rDNA.

المرئس	التتابع النوكليوتيدي	المرجع
أمامي	5'- GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA -3'	(Rasoul-Amini وآخرون، 2009)
عكسي	5'- AGGGCAGGGACGTAATCAACG -3'	

تم تحضير التفاعل باستخدام HotStar Polymerase Kit (Qiagen) وفق التعليمات المرفقة (الجدول 7):

الجدول 7. مكونات تفاعل PCR لتضخيم المنطقة 18S rDNA

المكونات	الحجم µl	التركيز النهائي
5x HotStar PCR Buffer	10	1x
10µM Forword Primerالمرئس الأمامي	1.5	0.3 µM
10µM Reverse Primerالمرئس العكسي	1.5	0.3 µM
DNA	2	50 ng
HotStar DNA Polymerase	1	2.5 units
RNase-free water	34	-
الحجم النهائي	50	–

يبين الجدول 8 مراحل التفاعل السـلسـلي للبوليمراز ضـمن المدوّر الحراري peqSTAR 96X universal Gradient (Germany) (Nübel، وآخرون، 1997):

الجدول 8. البرنامج الحراري لتفاعل PCR لتضخيم منطقة 18S rDNA

مراحل التفاعل		درجة الحرارة °C	المدة الزمنية min
الفصل الأولي Initiatial denaturation		94	5
35 دورة	فصل Denaturation	94	1
	التحام Annealing	54	1
	استطالة Extension	72	1
الاستطالة النهائية Final extension		72	7

2.2.2 الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR

تم التحقق من نجاح التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR بترحيل المنتجات في هلامة أغاروز بتركيز 2%، وحقن سلم جزيئي 50bp (Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder؛ Fermentas) تحت جهد 100 فولت مدة ساعة ونصف (Sambrook، وآخرون، 1989).

2.2.3 تحضير ناتج التفاعل للتحليل في جهاز تحديد التتابعات الآلي Sequencer DNA

2.2.3.1 معالجة نواتج تفاعل PCR بالإنزيمات

أمكن التخلص من المرئسات غير المرتبطة Unincorporated primers والنوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات dNTPs الفائضة باستخدام العتيدة (ExoSAP-IT USB® affymetrix)، وفق التعليمات المرفقة. هو مزيج من الإنزيمين Exonuclease I وShrimp Alkaline Phosphatase، فقد أضيف 2µl من ExoSAP-IT إلى 5µl من ناتج تفاعل PCR النهائي، وكان التحضين بعدها على مرحلتين:

- 15 دقيقة عند درجة حرارة 37°C.
- 15 دقيقة عند درجة حرارة 80°C.

2.2.3.2 وسم قطعة الدنا DNA الهدف بالنوكليوتيدات المتألقة

أُجري تفاعل تحديد التتابع النوكليوتيدي باستخدام العتيدة The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystem, USA) الحاوية على نوكليوتيدات محورة Dideoxynucleotides

موسومة بصباغ متألق وإضافة أحد المرئسين؛ الأمامي أو العكسي، ونواتج التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR المعالجة مسبقاً وفق التعليمات المرفقة كما هو موضح في الجدول 9:

الجدول 9. مكونات تفاعل PCR لتحديد التتابع النوكليوتيدي

المكونات Components	الحجم µl
Terminator Ready Reaction Mix	8
المرئس (10µM) Primer	0.5
5X Dilution Buffer	4
(150ng) DNA	1
RNase-free water	6.5
الحجم النهائي	20

أنجز تفاعل السلسلة Cycle sequencing ضمن المدوّر الحراري وفق البرنامج الحراري المبيّن في الجدول 10:

الجدول 10. البرنامج الحراري لتفاعل Cycle sequencing

	مراحل التفاعل	درجة الحرارة °C	المدة الزمنية
30 دورة	فصل Denaturation	96	10 sec
	التحام Annealing	50	5 sec
	استطالة Extension	72	4 min

معدّل تبدّل درجات الحرارة =1°C/sec

2.2.3.3 تنقية نواتج تفاعل السلسلة Cycle sequencing

تم التخلص من فائض كل من النوكليوتيدات المتألقة Unincorporated dye terminators والمرئس والإنزيم بعد تفاعل Cycle sequencing باستخدام العتيدة DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) واتباع التعليمات المرفقة.

جُفّفت النواتج النقية باستخدام المجفف بالدوران تحت التفريغ CentriVap Concentrator ماركة Labconco عند درجة حرارة 45°م، مدة 15 دقيقة. بعدها، تم حلّ عينات الدنا DNA المجففة في 12 µl فورماميد منزوع الشوارد بدرجة عالية Highly Deionized Formamide (ABI)، ووُضعت العينات في جهاز سلسلة الدنا الآلي ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) .

2.2.4 التحليل الوراثي

جرى تحرير البيانات وتدقيقها باستخدام برنامج BioEdit Sequence Alignment editor، الإصدار 7.2.5 (Hall، 1999)، وبعد طي التتابعات الطرفية منخفضة الجودة جُمعت قراءات قطع التتابعات الناتجة عن كلا المرئسين، ورُصفت في متجاورات Contiguous متراكبة Overlapping للحصول على التتابع الكامل. تم الاستعانة بتتابعات المنطقة 18S rRNA المنشورة على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني للمعلومات الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) لتعيين هوية النوع. تبع ذلك إجراء الاصطفاف المتعدد Multiple Alignment ورسم شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج ClustalX 2.1 (Larkin، وآخرون، 2007) وكان عرض الشجرة باستخدام برنامج TreeViewX، الإصدار 0.5.0.

2.3 تنمية الطحلب وإكثاره

تمت عملية التنمية والإكثار وفق نظام الدفعات Batch ضمن المفاعل الحيوي المصمّم والمعدّل في الهيئة العامة للتقانة الحيوية لغرض دراسة نمو الطحالب الخضراء الدقيقة (Okkou، وآخرون، 2018)، باستخدام الوسط المغذي Bold's Basal Medium: BBM الخاص بتنمية هذه الطحالب (Bold & Bischoff، 1963)؛ أُذيبت الأملاح التالية كلاً على حده، في 400 mL من الماء المقطر، إذ حُضِّر في النهاية ستة محاليل مستقلة:

$NaNO_3$	g10	$MgSO_4 .7H_2O$	g 3	KH_2PO_4	g 7
$CaCl_2. 2H_2O$	g 1	K_2HPO_4	g 3	NaCl	g 1

ثمّ أضيف 10 mL من كل محلول إلى 940 mL من الماء المقطر، و1 mL من كل من المحاليل الآتية:

- 50 g Na_2 EDTA/ 1000 mL ماء مقطر
- 4.98 g $FeSO_4 .7 H_2O$/ 1000 mL ماء مقطر (1 mL H_2SO_4/ 1000 mL ماء مقطر)
- 11.42 g H_3BO_3/ 1000 mL ماء مقطر
- {8.82 g) $ZnSO_4 .7 H_2O$ و(1.44 g) $MnCl_2 .4 H_2O$ و(0.71 g) MoO_3 و(1.57 g) $CuSO_4 .5 H_2O$ و(0.49 g) $Co(NO_3)_2. 6 H_2O$}/ 1000 mL ماء مقطر.

كانت التنمية تحت ظروف ثابتة هي الأكثر ملاءمة للنمو ولتركيب البروتين حسب عكّو وزملائه (2017)؛ إضاءة مستمرة 10000 لوكس، سرعة دوران 250 rpm، تدفق غازات 2 min/L، تركيز CO2 500 ppm، ودرجة حرارة 25 م°، وتركيز نترات الصوديوم 0.25 L/g، وpH= 7. بدأت عملية التنمية في كل دفعة بتلقيح وسط الطحالب BBM داخل المفاعل الحيوي بكمية من المزرعة النقية للطحالب (بادئ) المحضرة مسبقاً حتى وصلت الامتصاصية الضوئية لوسط النمو إلى 1.5 عند طول موجة 680 نانومتراً.

2.4 استحصال الكتلة الحيوية للطحالب كمادة جافة

في نهاية طور النمو اللوغاريتمي؛ في اليوم 14 من التلقيح (عكّو وآخرون، 2017)، فُصلت الكتلة الحيوية للطحالب باستخدام جهاز فصل الطحالب المصمم في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، ثم جرى تجفيدها للمحافظة على مركباتها الكيميائية بشكلها الأمثل (Molina-Grima، وآخرون، 2003) باستعمال المجفدة ماركة Christ الألمانية طراز Alpha 1-2 LD تعمل على درجة حرارة −55 م° مزودة بمضخة من الماركة ذاتها تعمل بقوة تفريغ 2.8 m^3/h تقابل انخفاض ضغط حتى $10x4^{-4}$ ميلي باراً. حُفظت الكتلة المجفدة مجمدة في عبوات محكمة الإغلاق استعداداً للتحاليل الكيميائية.

2.5 إضافة الكتلة الجافة للطحلب إلى منتج غذائي

أمكن تصنيع البسكويت حسب وصفة Gouveia وزملائها (2007) المعدَّلة؛ 52% طحين قمح، 17.5% سكر، 20% سمن، 0.5% مسحوق الخبز (باكينغ بودر)، 10% ماء، وفي معاملات البسكويت، أُضيفت كتلة الطحلب الجافة إلى المقادير السابقة بنسبة 1%، 3%، 5% من وزن الطحين. كما هو موضح في الجدول 11.

الجدول 11. المواد المضافة في معاملات البسكويت مقدرة بالوحدة g100/g.

المكونات	الشاهد	%1	%3	%5
طحين القمح	52	51.48	50.44	49.4
سكر	17.5	17.5	17.5	17.5
سمن	20	20	20	20
ماء	10	10	10	10
مسحوق الخبز	0.5	0.5	0.5	0.5
كتلة الطحلب الجافة	0	0.52	1.56	2.6

وُزنت المقادير وخُلطت المكونات الجافة أولاً، ثم عُجنت بالسمن ومقدار الماء واستمر العجن حتى الحصول على عجينة متماسكة، ليصار بعدها إلى فرد العجين بالمرقاق (الشوبك، النشابة) بسماكة 0.5 mm تقريباً وتشكيله بقوالب خاصة للبسكويت إلى قطع مختلفة الأشكال خُبزت في الفرن بعد تسخينه مسبقاً إلى درجة حرارة 120 مºمدة 20 دقيقة. تم تبريد قطع البسكويت وحفظها في مكان جاف بعيداً عن الضوء.

2.6 التحليل الكيميائي للكتلة الحيوية الجافة للطحلب ومعاملات البسكويت

2.6.1 تقدير الرطوبة

قُدِّرت الرطوبة كنسبة مئوية عن طريق وزن العينة قبل التجفيف وبعده عند درجة حرارة 105°م حتى ثبات الوزن؛ حسب AOAC (2000).

2.6.2 تقدير البروتين

قُدِّرت نسبة الآزوت الكلي بطريقة كلدال Kjeldahl method وفق الطريقة رقم AOAC 984.13 (2000)، وحُسبت نسبة البروتين في العينة وفق المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للبروتين} = \text{النسبة المئوية للآزوت} \times \mathbf{6.25}$$

2.6.3 تقدير مضادات التأكسد

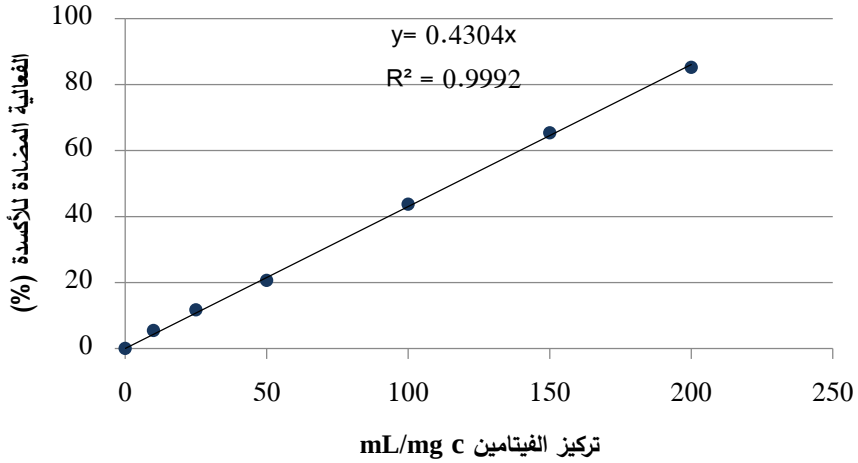
حُضّر مستخلص الطحلب وفق طريقة متاكي وزملائه (Mtaki، وآخرون، 2020) المعدّلة؛ إذ أُخذ 0.1 g من الكتلة الحيوية الجافة وطُحنت باستخدام جهاز TissueLyser LT (Qiagen)، ثمّ أُضيف إليها 2 mL من الإيتانول 50%، وبعد الرجّ لضمان التجانس، جرى تحضينها ضمن حمام للأمواج فوق الصوتية عند درجة حرارة 40 درجة مئوية مدة ساعة، ثم حُضنت عند درجة حرارة 4°م مدة 20 ساعة ليُصار إلى تثفيلها بسرعة 10.000 g مدة 10 دقائق، وسُحب الطافي وحُفظ عند −20 درجة لحين القياس.

أُخذ 250 µl من المستخلص وأضيف إليها 1 mL من كاشف DPPH -2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) في الإيثانول (4.5 L/mg)، وُضعت الأنابيب بعد الخلط بعيداً عن الضوء في درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة، ثمّ قيست الامتصاصية باستعمال المطيافية الضوئية Spectrophotometer عند طول

الموجة 515 نانومتراً. عُرضت النتائج مقارنة بالسلسلة العيارية للفيتامين C في الشكل 5 بتراكيز بين 0 و200 mL/mg كمركّب مرجعيّ لاختبار كنس الجذور الحرة وحساب قدرة الخلاصة على تثبيط الجذور الحرة (Savvidou، وآخرون، 2023) استُعملت المعادلة:

$$DPPH\% = \left[\frac{Ab - Aa}{Ab}\right] * 100$$

حيث: A_a الكثافة الضوئية للعينة مع الكاشف، A_b الكثافة الضوئية للكاشف.



الشكل 5. السلسلة العيارية للفيتامين C

IC_{50}: التركيز المثبط النصفي للجذور الحرة من الفيتامين C (IC_{50} = 116.171 mL/mg).

2.6.4 تقدير بعض الفيتامينات

استُعملت الطريقة رقم 14130 حسب لجنة المعايير الأوروبية European Standard EN (CEN، 2003) والمعدَّلة بفضل Engel وزملائها (2010) لتقدير بعض الفيتامينات المنحلة في الماء مع إجراء بعض التعديلات؛ أُخذ 1g من كل عينة وأُضيف إليها 5 mL من محلول 2% ميتافوسفوريك أسيد، ووُضعت في حمام أمواج فوق صوتية sonicator ماركة BIOBASE مدة 10 دقائق (sec10 تشغيل/sec10 إطفاء) بغرض تحطيم الجدر الخلوية، ثم صُفّت العينات لتثفيلها مدة 15 دقيقة بسرعة 6000 rpm عند درجة حرارة 4 درجة مئوية باستخدام مثفلة ماركة Heraeus، سُحب الطافي لترشيحه باستخدام مرشحة قطرها 0.45 mμ، ثم أُخذ منه 1 mL ليُضاف إليه 0.5 mL من محلول 1% سيستئين، ثم محلول الأمونيا الممدد (1: 5) ليصبح pH= 7، ثم الخلط مدة 5

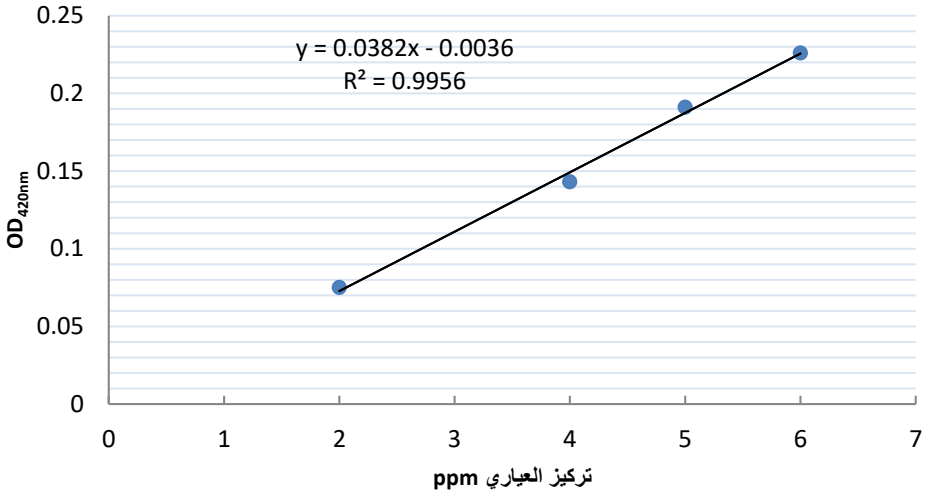
دقائق، ويُضاف بعدها محلول 20% ميتافوسفوريك أسيد لجعل pH= 2.5، لتصبح العينات جاهزة للحقن في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC مع كاشف UV.

2.6.5 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية

تم تقدير الرماد كنسبة مئوية وفق الطريقة المتبعة في المختبر الوطني للطاقة المتجددة (NREL) رقم TP-5100-60956 (Laurens & Van wychen، 2015)، حيث تم ترميد 2g من كل عينة في جفنة ضمن المرمدة مدة 24 ساعة، وحُسب وزن الرماد كنسبة مئوية وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للرماد} = \frac{\text{وزن الرماد}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

تم تقدير العناصر المعدنية حسب AOAC (2000) الطريقة رقم 975.03 (3.2.05). حيث أُضيف إلى رماد كل عينة 2 mL من حمض كلور الماء (تركيز 25%) ونُقلت نقلاً كمياً إلى دورق معياري لإتمام الحجم إلى 100 mL بالماء المقطر، بعدها جرى تحضين الدوارق في حمام مائي بدرجة حرارة 60 م° مدة ساعة واحدة، وبعد تبريدها رُشِّحت لتصبح جاهزة للكشف عن محتواها من البوتاسيوم باستخدام جهاز مطياف اللهب Flame Photometer ماركة BWB البريطانية، وعن محتواها من العناصر الصغرى (الحديد والمنغنيز والنحاس) باستخدام مطياف الامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrometer ماركة Varian الأمريكية، وفق تعليمات الشركة الصانعة لكل مطياف. أمّا عنصر الفوسفور، فقد تم تقديره باستخدام طريقة الفاندات اللونية حسب AOAC (2000) الطريقة رقم 966.01 (3.4.09) 50.1.12 و50.1.15، حيث أُضيف 1 mL من كاشف فاندات–مولبيدات إلى 5 mL من مستخلص الرماد لكل عينة، وأُكمل الحجم إلى 50 mL بالماء المقطر، وبعد نصف ساعة من وضعها في الظلام، يتفاعل الفوسفور بصورة أورثوفوسفات مع الكاشف لإعطاء معقد أصفر–برتقالي، تُقاس الكثافة الضوئية عند طول موجة 420 نانومتراً باستخدام المطيافية الضوئية Spectrophotometer، وباستخدام منحنٍ عياري لمحلول فوسفات أحادية البوتاسيوم KH_2PO_4 (100 ppm) (الشكل 6) كان تحديد تركيز الفوسفور في كل عينة.



الشكل 6. المنحنى العياري ومعادلة خط الانحدار للعلاقة بين الامتصاصية OD420nm وتركيز الفوسفور.

2.7 الاختبار الحسي

أُجري الاختبار الحسي في غرفة هادئة ذات حرارة معتدلة وجيدة الإضاءة والتهوية بما يتناسب مع معيار EN ISO 8589، مع التقيد بجميع الضوابط اللازمة لاختبار التذوق (شرب الماء بين كل تذوق، عدم تواصل المشاركين فيما بينهم، .. الخ) (Watts، وآخرون، 1989)، لملء استمارة تقييم البسكويت المدعّم والشاهد من حيث اللون والرائحة والمذاق والقوام والإحساس بعد المضغ والقبول العام وفق سلّم Likert المكوَّن من 5 مستويات من "أحببته كثيراً" إلى "لم أحبه أبداً (Likert، 1932)، وكذلك عبّر المشاركون في التقييم الحسي عن درجة استعدادهم لشراء معاملات البسكويت المعروضة عليهم من خلال ملء استمارة "تقييم نية الشراء" وفق 5 مستوياتٍ أيضاً: من "سأشتري حتماً" إلى "لن أشتري". سبق التقييم الحسي الإجابة على استبيان اختبار رهاب الأغذية الجديدة food neophopia scale: FNS؛ وهو عشرة أسئلة يجيب عنها المشارك وفق مقياس Likert المكوَّن من خمسة مستويات كذلك، من "غير موافق أبداً" إلى "موافق بشدة"، انظر الملحق.

شارك في التقييم الحسي 28 فرداً بالغاً (الجدول 12)، تراوحت أعمارهم بين 23–70 عاماً (متوسط العمر=39.92، SD= 12.592)، وقد بلغ متوسط أعمار الذكور والإناث 50.25±015.22 و35.33±8.08 عاماً، على الترتيب. كما جرى تقسيم المشاركين إلى ثلاث فئات عمرية، من أجل استكشاف الاختلافات المحتملة المتعلقة بالعمر.

الجدول 12. توزع المشاركين في الاختبار الحسي وفقاً لجنس الفرد والعمر (بالأعوام) للمشاركين في الاختبار الحسي.

توزع المشاركين	المجموعات	عدد الأفراد	النسبة المئوية %
التوزع وفقاً للجنس	الذكور	10	35.7
	الإناث	18	64.3
	المجموع	28	100
التوزع وفقاً للعمر (بالأعوام)	35-20	11	42.3
	45-36	9	34.6
	46≤	6	23.1
المجموع	70-23	26	100

2.8 التحليل الإحصائي

أُجري التحليل الإحصائي وفق التصميم العشوائي البسيط، باستخدام برنامج SPSS النسخة 17، بتطبيق اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه One-Way ANOVA عند مستوى ثقة 99%.

فيما يتعلق بالاختبار الحسي، رُمِّز سلّم Likert المكوَّن من 5 مستويات من "أحببته كثيراً" إلى "لم أحبه أبداً" بالأرقام من 5 إلى 1 على الترتيب، وأجريت الاختبارات الإحصائية لتحديد الفروق بين متوسطات تقييم المشاركين لمعاملات البسكويت، وبين متوسطات قيم تقييم كل معيار حسي على حدة أيضاً، عند مستوى ثقة 95%. أما بالنسبة لاستمارة FNS فقد أُعطيت مستويات سُلَّم Likert من: "غير موافق أبداً" إلى "موافق بشدة" الأرقام من 1 إلى 5، على الترتيب، للأسئلة ذات الأرقام: 2، 3، 5، 7، 8، وبصورة عكسية لبقية الأسئلة، ليتم حساب مجموع رصيد جميع الأسئلة لكل مشارك على حدة. وفقاً لذلك، تتراوح الدرجات الإجمالية لهذا المقياس بين 10 و50، وجرى تصنيف المشارك بناءً على درجته الإجمالية إلى ثلاث فئات بالاستناد إلى قيمتي المتوسط الحسابي والانحراف المعياري؛ كثير الرهاب ذو الدرجة الأعلى من مجموع المتوسط والانحراف المعياري، وقليل الرهاب ذو الدرجة الأدنى من فرق المتوسط والانحراف المعياري، والبقية تضمنتها الفئة متوسطة الرهاب، وأُجريت الاختبارات الإحصائية لدراسة علاقة كل من الجنس والفئة العمرية على حالة FNS وتأثيره في نتائج التقييم الحسي عند مستوى ثقة 95%.

الفصل الثالث

النتـــائـج والمنـاقشـة

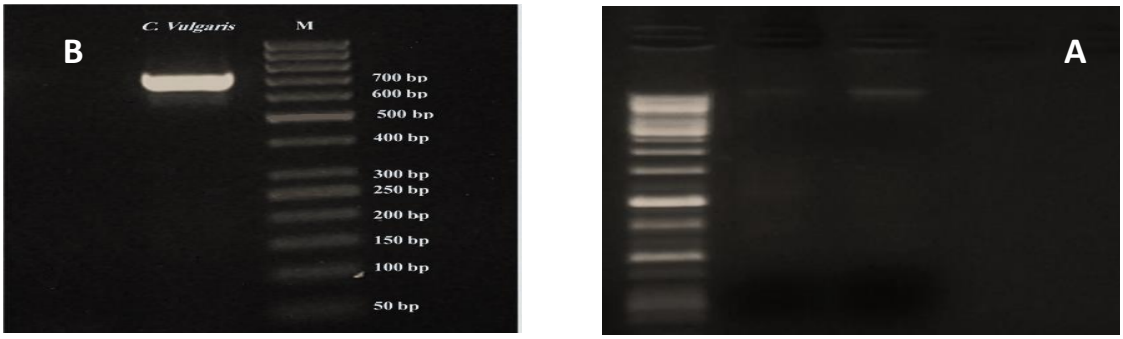
Results and Discussion

3. النتـــائـج والمنـاقشـة

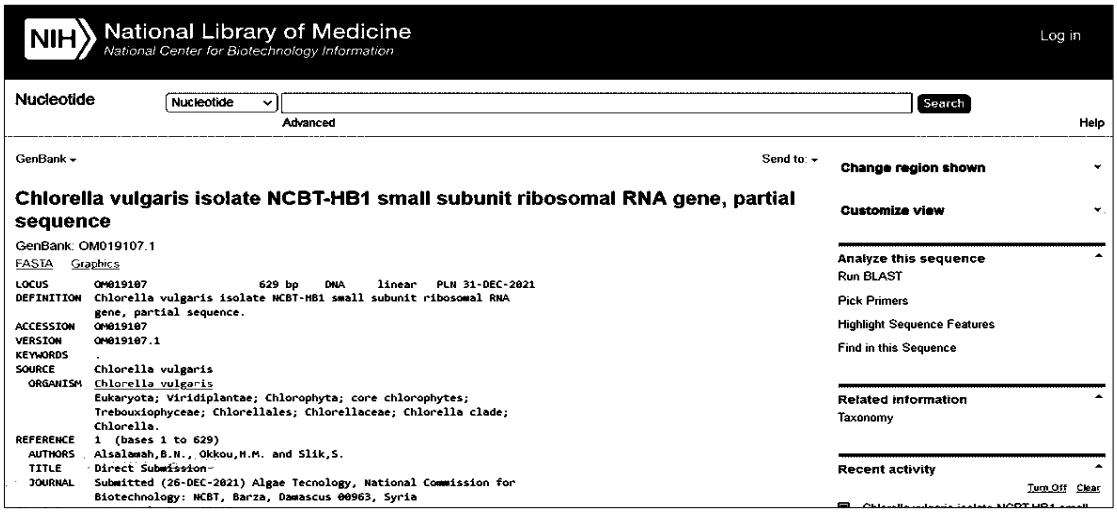
3.1 التعريف الجزيئي للنوع *Chlorella vulgaris*

3.1.1 تحديد ومقارنة تتابعات منطقة 18S rDNA

عُزل الدنا من الكتلة الحيوية للطحلب ليظهر سليماً كحزمة وحيدة واضحة بعد ترحيله في هلام الأغاروز (الشكل 7-A). كان التفاعل السلسلي للبوليميراز باستخدام المرئستين النوعيتين للمنطقة /18S rDNA/ فعالاً، وأعطى حزمة وحيدة على هلامة الأغاروز، كما في الشكل 7-B، بلغ طولها 664bp عند تحديد التتابعات النوكليوتيدية، ولم يتجاوز طول القطعة المراد تحليلها 629bp، بسبب استبعاد التتابعات الطرفية منخفضة النوعية في النهايتين 5' و3' من التحليل. أُودعت التتابعات النوكليوتيدية لقطعة الدنا DNA المدروسة في قاعدة بيانات البنك الوراثي التابع لمركز NCBI وأُعطيت رقم الدخول OM019107، الشكل 8.



الشكل 7. الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز، A: حزمة الدنا DNA الكلي في هلامة الأغاروز 1%، B: الحزمة الناتجة عن تضخيم منطقة 18S rDNA في تفاعل PCR، في هلامة الأغاروز 2%.



الشكل 8. السجل الخاص بإيداع العينة في قاعدة بيانات البنك الوراثي NCBI.

بلغت النسبة GC% في القطعة المدروسة 46.9%، وعموماً تتراوح نسبة GC% في جينوم هذا الجنس بين 43% إلى 78% (Kessler، 1976). وإن المقارنة بتتابعات منطقة تحت وحدة الرنا الريبوزومي الصغيرة 18S rDNA من الطحالب الدقيقة الأخرى في NCBI كشفت تشابهاً أعظمياً بلغ 99.84% مع كل من الأجناس *Coelestrella* و*Scenedesmus* و*Asterarcys*، وبلغت أعظم نسبة تشابه مع تتابعات النوع *Chlorella vulgaris* ذاته 97.79 % مع نسبة تغطية 64%، وقد بلغت عند نسبة التغطية الكاملة 100% في حدها الأعظمي 95.39%، وكانت نسبة معنوية نتيجة البحث قيمة الصفر (أفضل قيمة لنسبة المعنوية)، حيث تم استُعمل التتابع المدروس كاستعلام في عمليات البحث على الموقع (//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) BLASTN، لتحديد أقرب تطابق يمكن تعرُّفه وهو موجود في قاعدة بيانات النوكليوتيدات GenBank الكاملة (الجدول 13).

الجدول 13. بعض نتائج مقارنة التتابع المدروس بالتتابعات المسجلة في NCBI باستخدام BLAST.

رقم الإدخال	الاسم العلمي	نسبة التشابه%	نسبة التغطية%	الطول bp	المعنوية
MN719510.1	*Coelastrella* sp. IS3	99.84	100	697	0
MH176109.1	*Asterarcys quadricellulare*	99.84	100	1699	0
MH176108.1	*Coelastrella tenuitheca*	99.84	100	1675	0
MH683869.1	*Scenedesmus* sp. YACCYB359	99.84	100	1686	0
KX395729.1	*Chlorophyta* sp. SL-2016	99.84	100	1790	0
KM087966.1	*Chlorella emersonii*	99.84	100	1021	0
KC218489.1	*Scenedesmus acutus*	99.84	100	1035	0
MH807090.1	uncultured *Chlorophyceae*	99.68	100	2079	0
KU720636.1	*Chlorella vulgaris*	97.79	64	1238	0
KY922961.1	*Chlorella vulgaris*	97.75	63	1239	0
KC470056.1	*Chlorella vulgaris*	97.65	60	466	0
AB080308.1	*Chlorella vulgaris*	95.39	100	1791	0
AY591515.1	*Chlorella vulgaris*	94.91	100	1777	0
AB162910.1	*Chlorella vulgaris*	95.23	100	2494	0
EU374170.2	*Chlorella vulgaris*	95.18	98	621	0
EU374171.1	*Chlorella vulgaris*	95.14	98	617	0
EU374169.1	*Chlorella vulgaris*	95.23	100	630	0
EU375837.2	*Chlorella vulgaris*	95.21	99	629	0
EU379938.1	*Chlorella vulgaris*	95.03	96	602	0

لم تُظهر النتائج تشابهَ تتابعات العينة مع النوع *C. vulgaris* فقط، بل تشابهت مع العديد من التتابعات المنشورة ضمن شعبة *Chlorophyta*؛ صف *Chlorophyceae* و *Trebouxiophyceae*؛ فصيلتي *Scenedesmusceae* و*Chlorellaceae* على التوالي، فالعينة إما ذات صلة بالجنس *Coelastrella* أو

Asterarcys أو *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*) أو بالجنس *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*)، وهذا جاء منسجماً مع ما أقرّته دراسات سابقة في أن المطابقة بين التعريف الشكلي للطحالب وذاك الجزيئي لا تكون عالية كما هو متوقع لها أن تكون (Bock & Krienitz، 2012؛ Manoylov، 2014)؛ الأمر الذي يمكن أن يُعزى إلى أن دقة التتابعات في البنك الوراثي والتعريفات المرفقة بها متباينة للغاية (Meiklejohn، وآخرون، 2019) بسبب عدم تحديث سجلات البنك الوراثي لمواكبة المراجعات التصنيفية، أو عدم تحديد التتابعات المدخلة على نحو صحيح جراء ارتكاب الأخطاء في أثناء الحصول على البيانات أو معالجتها أو تقديمها (Fawley & Fawley، 2021) كالتفسير الخاطئ لطفرات الحذف– الإدخال وطفرات الاستبدال على أنها أنماط فردانية haplotypes فريدة (Sogin، وآخرون، 2006)، كل ذلك يضع في الحسبان إمكان التصنيف غير الدقيق لمدخلات البنك الوراثي (Manoylov، 2014؛ Dapra، 2016؛ Fawley & Fawley، 2021)؛ ما يستدعي التنويه إلى تكرار وقوع تعريفات غير دقيقة في قاعدة بيانات البنك الوراثي NCBI حتى للأنواع المدروسة جيداً؛ كالحشرات مثلاً، وبالتالي يرجّح أن تكون هذه الأخطاء أكثر تكراراً في الأحياء الأقل دراسة كالطحالب (Pentinsaari، وآخرون، 2020). ومع مشقة تصحيح هذه الأخطاء وإضافة بيانات جديدة يستمر احتمال وقوع الأخطاء التصنيفية (Fawley & Fawley، 2021).

وتجدر الإشارة إلى أن طول القطعة التي جرى تحليلها في هذه الدراسة نحو ربع طول المورثة 18S rDNA كاملاً فقط، وعليه لا يمكن استبعاد أن تختلف العينة أو تتشابه مع تلك التتابعات خارج المنطقة 18S rDNA (Görs، وآخرون، 2009؛ Fawley & Fawley، 2021). لذا، يمكن –والحال كذلك– التغلب على انحياز الاصطفاف باستخدام قواعد بيانات أكبر وأكثر شمولاً (Manoylov، 2014)، أو زيادة دقة التصنيف الجزيئي بالحصول على تتابعات أطول أو إشراك مورثات أكثر (Fawley & Fawley، 2021).

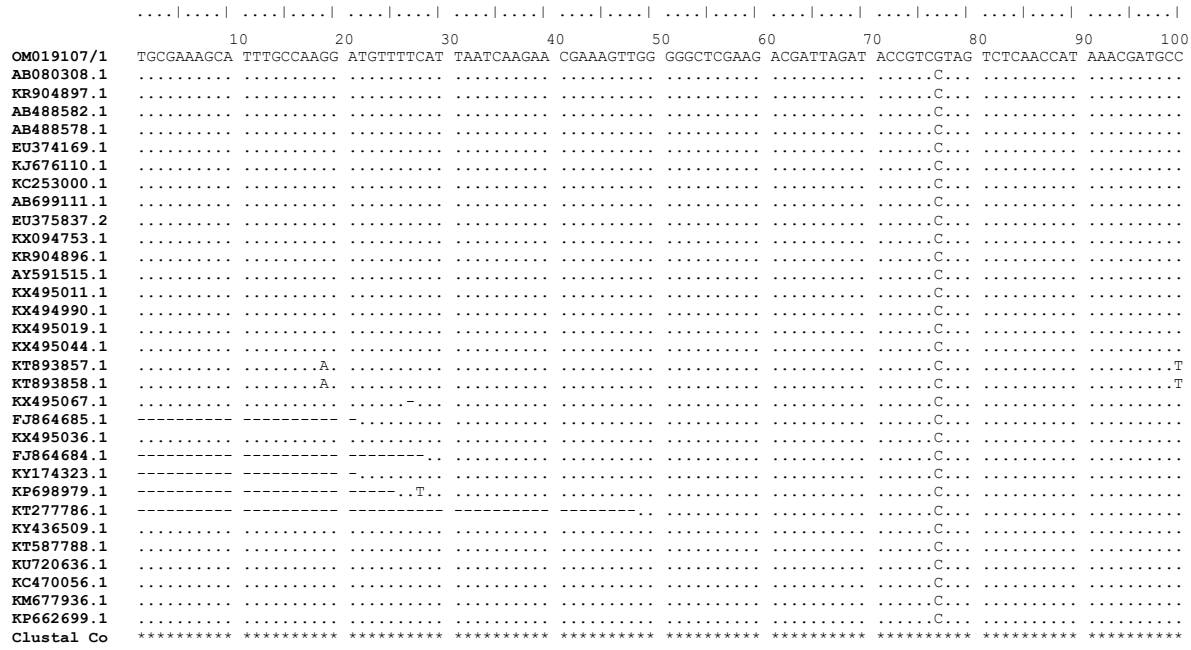
وبغرض فهم التشابه بين تتابعات المنطقة 18S rDNA للعينة *Chlorella vulgaris* والتتابعات الأخرى للكلوريلا *Chlorella* sp. في قاعدة بيانات NCBI وتأكيد هوية الطحلب أيضاً أُنشئت شجرة تطورية باستخدام مقاربة الاصطفاف المتعدد Multiple Sequence Alignment (MSA) لأنها أفضل طريقة لتحديد موضع تتابع

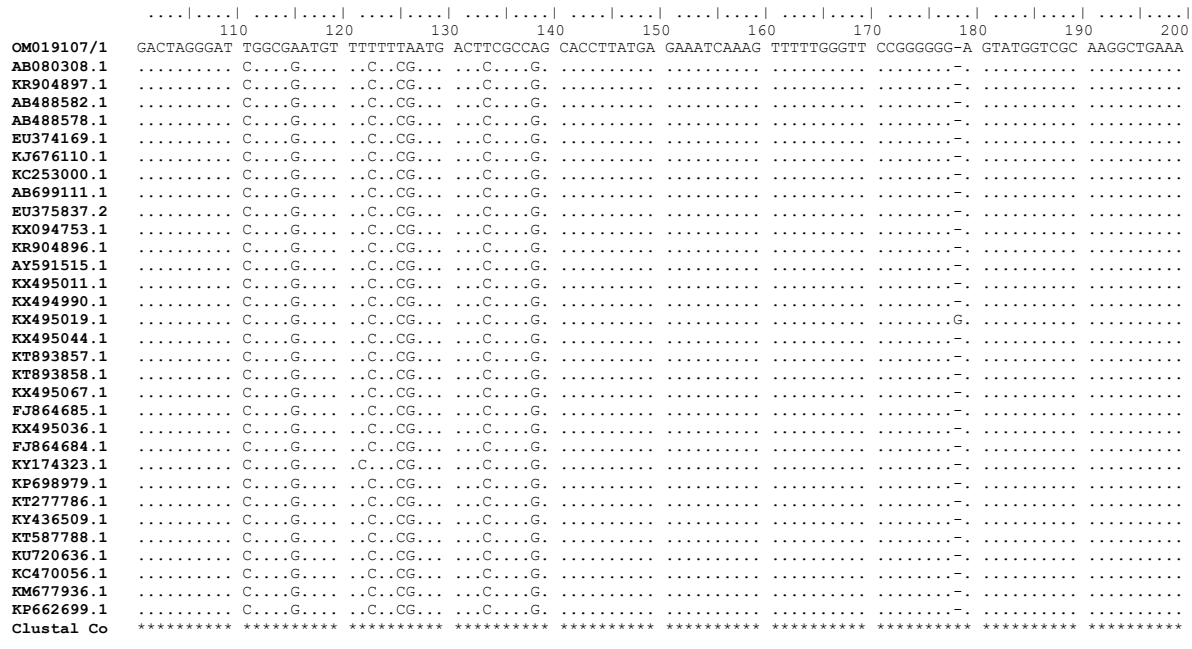
ما ضمن شجرة تطورية بموثوقية (López-Bautista، وآخرون، 2006؛ Hall، وآخرون، 2010؛ Lakshmana Senthil، وآخرون، 2019).

3.1.2 إنشاء شجرة القرابة الوراثية

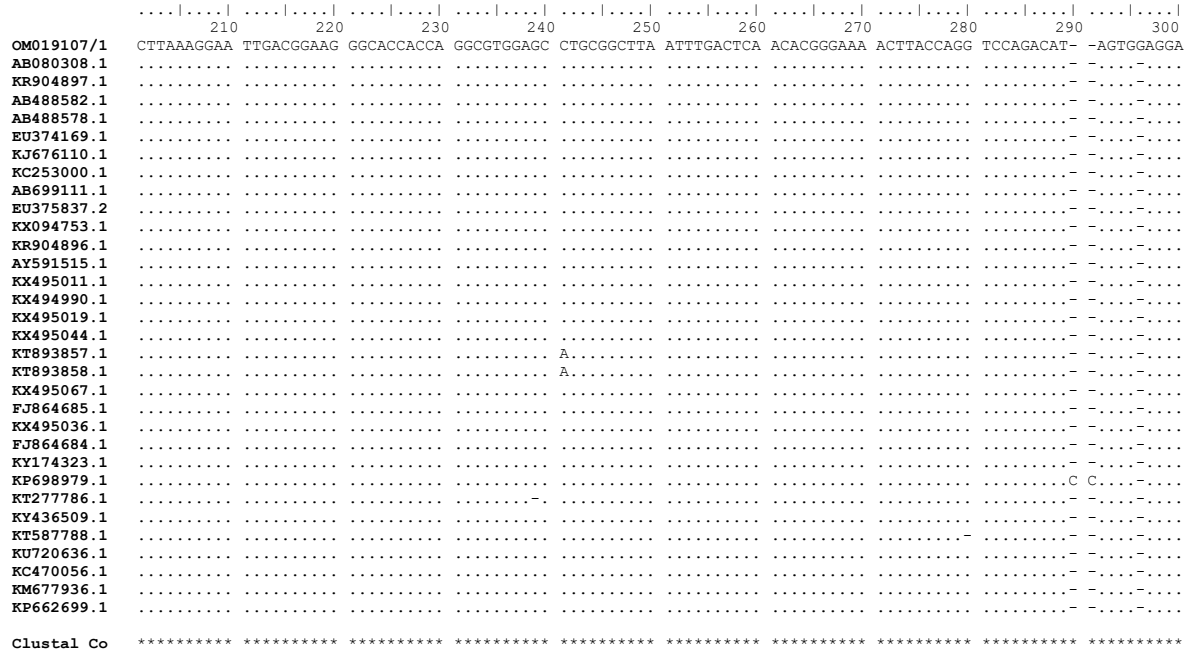
أُجري الاصطفاف المتعدد لـ 31 تتابعاً نوكليوتيدياً للكلوريلا من البنك الوراثي NCBI باستخدام برنامج ClustalX2 (الشكل 9). وعليه، جرى تحديد 315 نكليوتيداً ثابتاً constant من أصل 629 نكليوتيداً تمثل المنطقة المراد تحليلها، ووجد أن هناك 314 نوكليوتيداً متغيراً منها، وهذا يتفق مع دراسات سابقة ذكرت أن تتابعات المنطقة 18S rDNA تظهر تبايناً موضعياً كبيراً ضمن الأنواع المفردة المصنّفة اعتماداً على المعايير الشكلية morphotypes (Pfandl، وآخرون، 2009؛ Sigee & Bellinger، 2015، ص: 78).

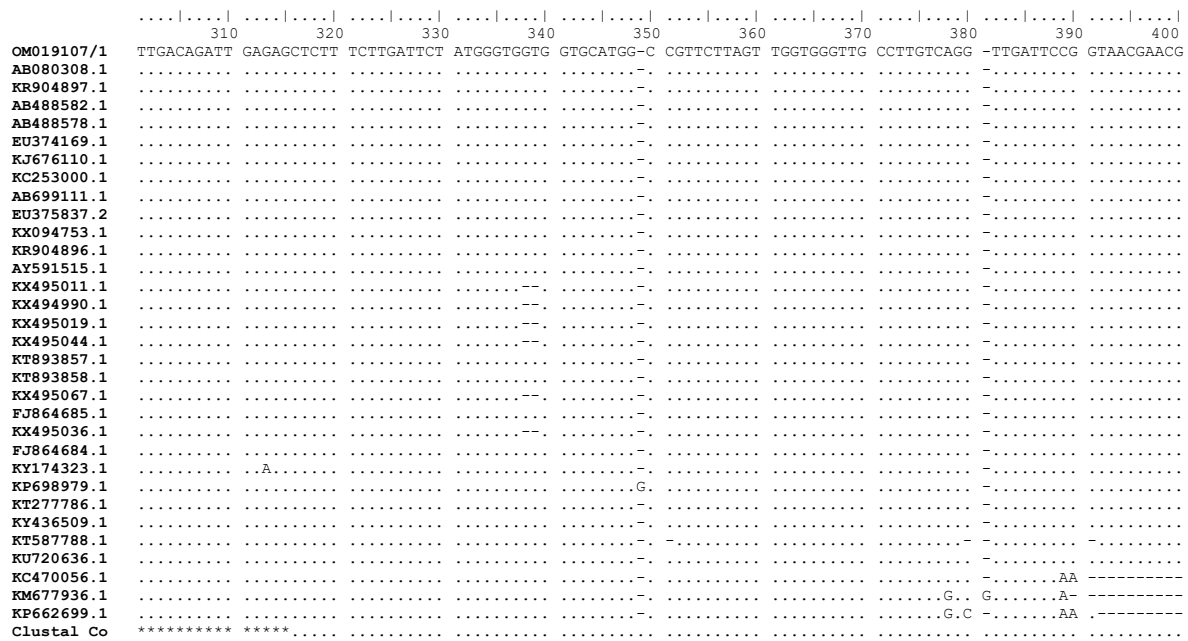
أُجري التحليل اعتماداً على خوارزمية ربط الجوار neighbor joining: NJ؛ بهدف تحديد علاقات القرابة الوراثية بين العينة المدروسة وما نُشر في البنك الوراثي تحت مسمى *Chlorella vulgaris* إضافة إلى جنسين خارجيين out group. ويُلاحظ من الشكل 10 انفصال شجرة القرابة الوراثية إلى عناقيد رئيسة على نحو واضح، مدعومة بقيم Bootstraping عالية تدل على عدد مرات ظهور الفرع. ومما يجدر ذكره أن العينة المدروسة المُشار إليها بالرقم OM019107 لديها أعلى نسبة تشابه مع التتابع EU374169 وبقيم Bootstraping عالية؛ أي إن لهما سلفاً مشتركاً، كما أن أحد الجنسين الخارجيين تجمّع بقيمة Bootstrapping بلغت 100% مع أحد تتابعات *Chlorella* في مجموعة واحدة لينضم إليهما الجنس الخارجي الآخر ويتشكل تحت عنقود، ذلك أنه في الأشجار المعتمدة على المنطقة 18S، تتخذ بعض الأنواع المستخدمة في "التجميع الخارجي out grouping" موقعاً غير المتوقّع على الشجرة التطورية، فلا تتجمع منفردة عن البقية (Dapra، 2016).



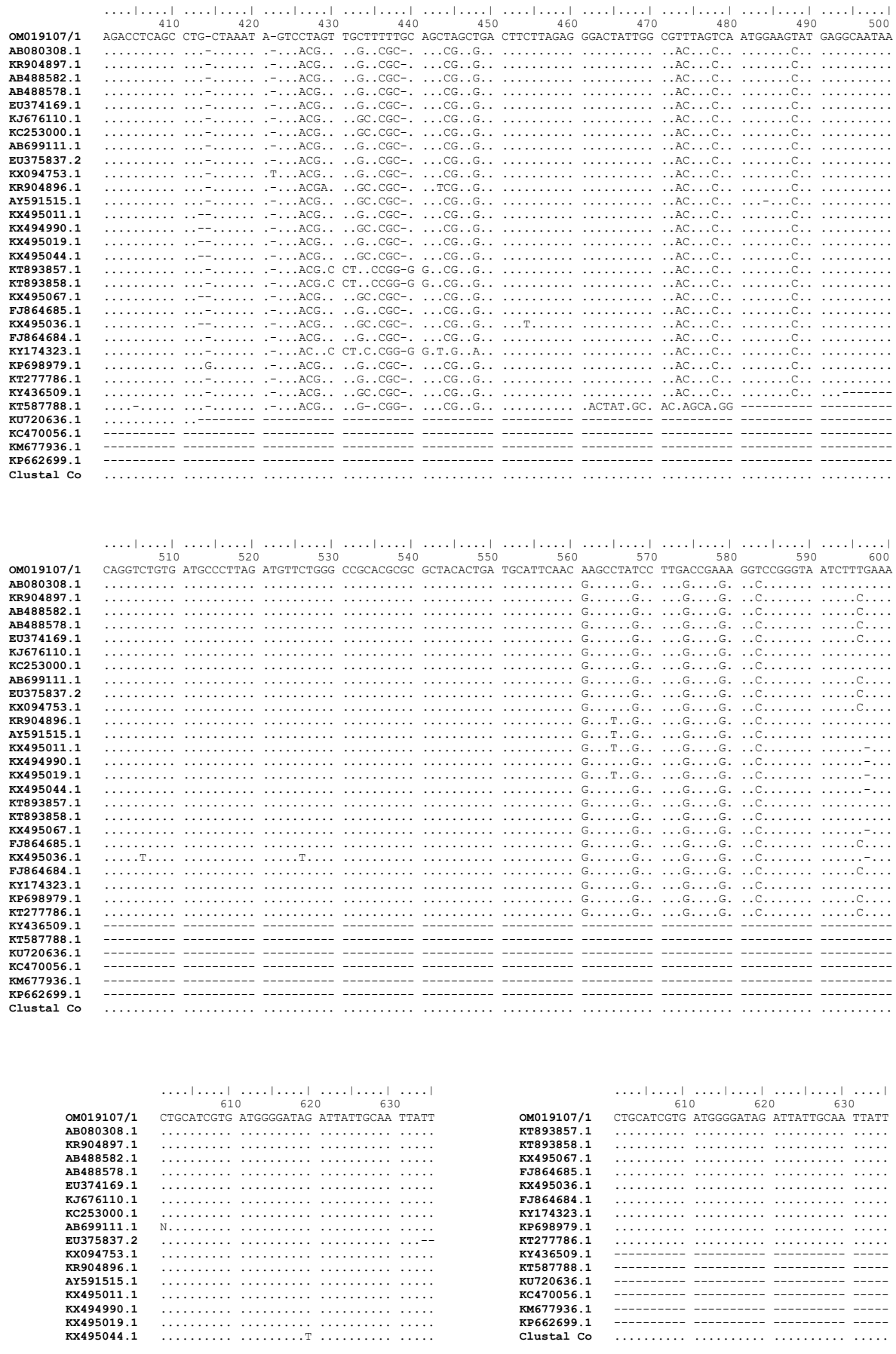


الشكل 9. الاصطفاف المتعدد لتتابعات منطقة 18S rDNA للعينة المدروسة باستخدام طريقة ClustalX.

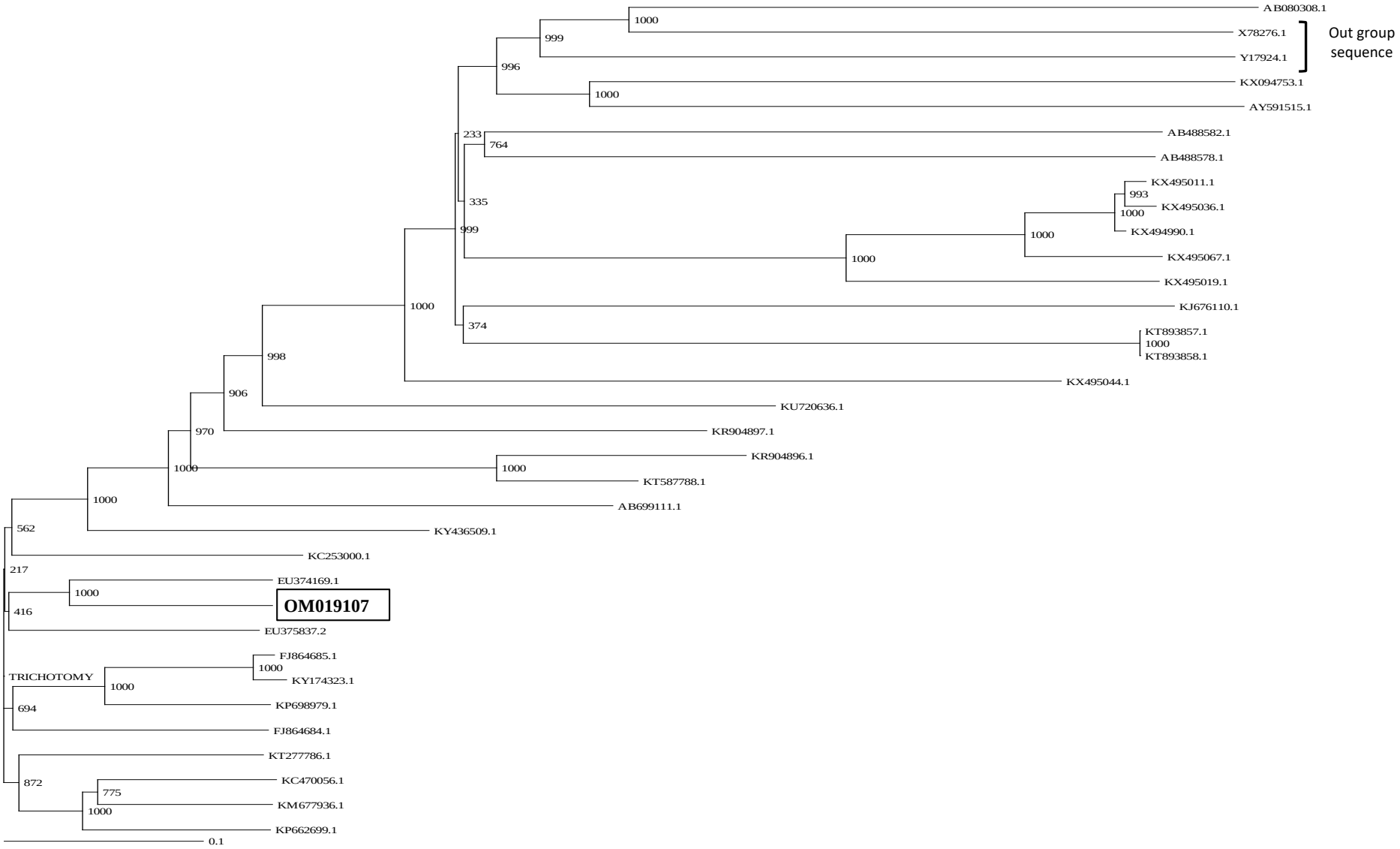

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
OM019107/1 CTTAAAGGAA TTGACGGAAG GGCACCACCA GGCGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACTCA ACACGGGAAA ACTTACCAGG TCCAGACAT- -AGTGGAGGA
AB080308.1 ....- -....-....
KR904897.1 ....- -....-....
AB488582.1 ....- -....-....
AB488578.1 ....- -....-....
EU374169.1 ....- -....-....
KJ676110.1 ....- -....-....
KC253000.1 ....- -....-....
AB699111.1 ....- -....-....
EU375837.2 ....- -....-....
KX094753.1 ....- -....-....
KR904896.1 ....- -....-....
AY591515.1 ....- -....-....
KX495011.1 ....- -....-....
KX494990.1 ....- -....-....
KX495019.1 ....- -....-....
KX495044.1 ....- -....-....
KT893857.1 .... A..... ....- -....-....
KT893858.1 .... A..... ....- -....-....
KX495067.1 ....- -....-....
FJ864685.1 ....- -....-....
KX495036.1 ....- -....-....
FJ864684.1 ....- -....-....
KY174323.1 ....- -....-....
KP698979.1 ....C C....-....
KT277786.1 ....-. ....- -....-....
KY436509.1 ....- -....-....
KT587788.1 ....- .....- -....-....
KU720636.1 ....- -....-....
KC470056.1 ....- -....-....
KM677936.1 ....- -....-....
KP662699.1 ....- -....-....
Clustal Co ********** ********** ********** ********** ********** ********** ********** ********** ********** **********


....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
OM019107/1 TTGACAGATT GAGAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGG-C CGTTCTTAGT TGGTGGGTTG CCTTGTCAGG -TTGATTCCG GTAACGAACG
AB080308.1 ....-. .... -..... .....
KR904897.1 ....-. .... -..... .....
AB488582.1 ....-. .... -..... .....
AB488578.1 ....-. .... -..... .....
EU374169.1 ....-. .... -..... .....
KJ676110.1 ....-. .... -..... .....
KC253000.1 ....-. .... -..... .....
AB699111.1 ....-. .... -..... .....
EU375837.2 ....-. .... -..... .....
KX094753.1 ....-. .... -..... .....
KR904896.1 ....-. .... -..... .....
AY591515.1 ....-. .... -..... .....
KX495011.1 ....--. .....-. .... -..... .....
KX494990.1 ....--. .....-. .... -..... .....
KX495019.1 ....--. .....-. .... -..... .....
KX495044.1 ....--. .....-. .... -..... .....
KT893857.1 ....-. .... -..... .....
KT893858.1 ....-. .... -..... .....
KX495067.1 ....--. .....-. .... -..... .....
FJ864685.1 ....-. .... -..... .....
KX495036.1 ....--. .....-. .... -..... .....
FJ864684.1 ....-. .... -..... .....
KY174323.1 ....A.... ....-. .... -..... .....
KP698979.1 ....G. .... -..... .....
KT277786.1 ....-. .... -..... .....
KY436509.1 ....-. .... -..... .....
KT587788.1 ....-. -..... ....- -..... -.....
KU720636.1 ....-. .... -..... .....
KC470056.1 ....-. .... -.....AA ----------
KM677936.1 ....-. ....G.. G.....A- ----------
KP662699.1 ....-. ....G.C -.....AA .----------
Clustal Co ********** *****..... ....

تتمة الشكل 9.

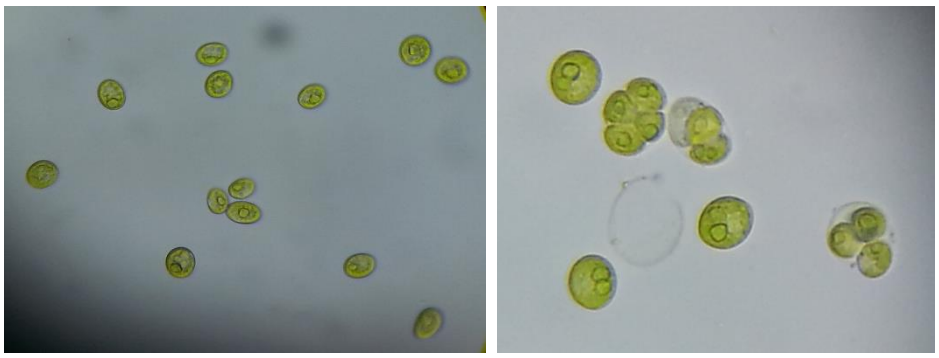

OM019107/1 AGACCTCAGC CTG-CTAAAT A-GTCCTAGT TGCTTTTTGC AGCTAGCTGA CTTCTTAGAG GGACTATTGG CGTTTAGTCA ATGGAAGTAT GAGGCAATAA
AB080308.1
KR904897.1
AB488582.1
AB488578.1
EU374169.1
KJ676110.1
KC253000.1
AB699111.1
EU375837.2
KX094753.1
KR904896.1
AY591515.1
KX495011.1
KX494990.1
KX495019.1
KX495044.1
KT893857.1
KT893858.1
KX495067.1
FJ864685.1
KX495036.1
FJ864684.1
KY174323.1
KP698979.1
KT277786.1
KY436509.1
KT587788.1
KU720636.1
KC470056.1
KM677936.1
KP662699.1
Clustal Co
OM019107/1 CAGGTCTGTG ATGCCCTTAG ATGTTCTGGG CCGCACGCGC GCTACACTGA TGCATTCAAC AAGCCTATCC TTGACCGAAA GGTCCGGGTA ATCTTTGAAA
OM019107/1 CTGCATCGTG ATGGGGATAG ATTATTGCAA TTATT
KT893857.1
KT893858.1
KX495067.1
FJ864685.1
KX495036.1
FJ864684.1
KY174323.1
KP698979.1
KT277786.1
KY436509.1
KT587788.1
KU720636.1
KC470056.1
KM677936.1
KP662699.1
Clustal Co

تتمة الشكل 9.



الشكل 10. شجرة القرابة الوراثية بناءً على تتابعات المنطقة 18S rDNA باستخدام طريقة ضم الجوار Neighbor-Joining، تشير الأرقام على العقد إلى اختبار bootstrap (1000 تكرار).

وبالنتيجة، لا يمكن الجزم بهوية العينة دون مقارنة الخصائص الشكلية، كما ذكرت دراسات سابقة أيضاً (Görs، وآخرون، 2009؛ Fawley & Fawley، 2021)، وقد تطابقت خلايا النوع المدروس شكلياً مع الخصائص الشكلية للنوع *Chlorella vulgaris* (الشكل 11).



الشكل 11. خلايا النوع *C. vulgaris* المدروس تحت المجهر الضوئي (تكبير 20X, 40X).

وهي بذلك بعيدة كل البعد في شكلها عن الخلايا في الجنس *Coelastrella* التي تتميز عنها ببنية جدارها الخلوي المزخرف بعدة أضلاع طولية (Bock & Krienitz، 2012؛ Guiry & Guiry، 2014؛ Wang، وآخرون، 2019؛ Goecke، وآخرون، 2020؛ Maltsev، وآخرون، 2021)، فضلاً عن ندرتها في المياه العذبة واستيطانها سطح التربة subaerial والمناطق البرية على نحو خاص (Wang، وآخرون، 2019)، والينابيع الحارة (Boutarfa، وآخرون، 2022). والخلايا الكروية للطحلب *Chlorella* تختلف عن خلايا الجنس *Scenedesmus* أسطوانية الشكل تقريباً (بيضوية إلى مغزلية)؛ يزيد طولها عادة على ضعف عرضها، والتي يمكن أن تتجمع في مستعمرات تترتب فيها الخلايا على نحو متناوب أو خطي (4– 32 خلية) (Bock & Krienitz، 2012؛ Sigee & Bellinger، 2015، ص:194)، وفي هذه الحال فهي تختلف أيضاً عن خلايا الجنس *Asterarcys* تلك التي تتشابه مع خلايا الجنس *Scenedesmus* في تشكيل المستعمرات؛ حيث تتجمع الخلايا البيضاوية غير المنتظمة في مستوٍ واحد أو اثنين على هيئة صليب أو كرة (4–8 خلايا) والصانعة الخضراء لها شكل الشبكة (Bock & Krienitz، 2012؛ Guiry & Guiry، 2019؛ Singh، وآخرون، 2019). وبذلك فقد توافقت هذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة أكّدت وجود أنواع من الطحالب تحمل أنماطاً وراثية متشابهة قريبة من *C. vulgaris*، ومع اختلافات ملحوظة في شكلها (Krienitz، وآخرون، 2004؛ Görs، وآخرون، 2009).

حتى الآن لا تغطي قواعد البيانات معظم مجموعات الطحالب إلى مستوىً كافٍ لتعرّف الطحالب، وغالباً ما توفر النشرة المرتبطة بالتتابع تعريفاً أفضل بكثير من وصف البنك الوراثي (Fawley & Fawley، 2021)، برغم أن بعضها يفتقر لذلك أيضاً مثل (Rasoul-Amini، وآخرون، 2009). ومن المتوقع أن يتغير المستوى المقبول من الأدلة لتحديد الأنواع بمرور الوقت مع ظهور تقنيات جديدة، ولكن حالياً تم اقتراح أن تحديد الأنواع يجب أن يتضمن مستوىً معيناً من التقييم المورفولوجي وتتابع مورث مناسب أو منطقة منه، كما يختلف مستوى أهمية هذين النوعين من البيانات باختلاف الكائن الحي الذي يجري تقييمه (Fawley & Fawley، 2021).

3.2 التحليل الكيميائي للكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Chlorella vulgaris*

3.2.1 تقدير البروتين

بينت النتائج أن نسبة البروتين في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* بلغت 40.54%±1.23، وهي موافقة لنتائج عكو وزملائه (2017) حيث تراوحت بين 21.18% و43.13% بسبب استخدام النوع ذاته وتطبيق الشروط المثلى للنمو الموصى بها في الدراسة، كما توافقت مع ما حصل عليه Seyfabadi وآخرون (2011) إذ تراوحت نسبة البروتينات الكلية بين 33% و46%، وكانت قريبة للنسبة 39.98% التي حصل عليها Kent وزملاؤه (2015) بعد التحليل الكمي للحموض الأمينية وجمع قيمها (Kent، وآخرون، 2015)، إلا أنها كانت أعلى من النسبة 21.9% التي حصل عليها (Liu، 2017) ومن النسبة 36% (Rasoul-Amini، وآخرون، 2009)، خلافاً لذلك، كانت نسبة البروتين في النوع المدروس أقل من 56.8% (Batista، وآخرون، 2017)، وخارج المجال 51 – 58% الذي حدّد المحتوى الكلي للبروتين للنوع *C. vulgaris* (Becker، 2007)؛ الأمر الذي يمكن أن يُعزى إلى اختلاف السلالة (Rasoul-Amini، وآخرون، 2009)، فضلاً عن اختلاف نسبة البروتين ضمن النوع نفسه باختلاف ظروف النمو (Samek، وآخرون، 2013) وطريقة التجفيف (Becker، 2007)، كذلك كانت أقل من 61% من الوزن الجاف (Gelgor، وآخرون، 2022) بسبب تقدير كمية البروتين الإجمالية بناءً على محتوى الطحلب *C. vulgaris* من البروتين القابل للذوبان في الماء، إذ أُعطي الأخير نسبة 43٪ من البروتين الكلي (Safi، وآخرون، 2013).

وهنا تجدر الإشارة إلى إمكان استخدام الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس كمكمل غذائي علفي غني بالبروتيسن، لاحتوائها نسبةً من البروتين (40.54%) تعادل ضعف الحد الأدنى المحدد لمحتوى المكمل الغذائي من البروتين (20٪ من الوزن الجاف) تقريباً وفق بيانات وزارة الزراعة والغذاء والشؤون الريفية في أونتاريو (Wright & Lackey، 2008).

3.2.2 تقدير مضادات التأكسد

كشف اختبار DPPH عن نشاط الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المضاد للتأكسد بنسبة تثبيط بلغت 50.94± 7.56 %، وهذا يأتي منسجماً مع ما ذكرته دراسات سابقة من غنى الطحالب الدقيقة عامةً بمضادات التأكسد (Mobin & Alam، 2017؛ Brunet & Sansone، 2019)، والطحلب *C. vulgaris* خاصة (Habashya، وآخرون، 2018؛ Mtaki، وآخرون، 2020؛ Agustina، وآخرون، 2021)، وتجدر الإشارة إلى أن خلاصة الإيتانول 50% قد حققت نسبة تثبيط تزيد على تلك لخلاصة الأسيتون 50.81٪ التي كانت حققت تفوقاً على كل من خلاصة الماء والإيتانول على حد سواء (Abdel-Karim، وآخرون، 2020).

وبالإسقاط على المنحنى العياري لفعالية الفيتامين C؛ مضاد التأكسد المرجعي، كانت فعاليّتها تفوق فعالية الفيتامين C في كنس الجذور الحرّة بمقدار 2.37 مرة؛ وبذلك كان النشاط المضاد للتأكسد لخلاصة الطحلب المدروس في الإيتانول 50% أكبر من ذاك لخلاصة الميتانول التي قارب نشاطها نشاط الفيتامين C ولم يتفوق عليه (El-fayoumy، وآخرون، 2021)، وأيضاً تفوق على الخلاصة المائية التي كانت أضعف من الفيتامين C في نشاطها ذاك (Habashya، وآخرون، 2018). ويمكن أن يُعزى هذا التباين إلى الاختلاف في سلالة الطحلب وشروط النمو (Gauthier، وآخرون، 2020؛ Coulombier، وآخرون، 2021) وطريقة تحضير المستخلصات الطحلبية، إذ يمكن للأخيرة أن تغير الفعالية المضادة للتأكسد بدرجة كبيرة (Ling، وآخرون، 2015)، إضافة إلى اختلاف المذيب المستخدم (Scaglioni، وآخرون، 2018)؛ الأمر الذي يجعل من الصعوبة بمكان إجراء مقارنات لنشاط مضادات التأكسد بين الدراسات (Wells، وآخرون، 2017) ما لم تُطبّق ذات الطريقة في القياس، وفق توصيات AOAC (Plank، وآخرون، 2012)، ويزيد على ذلك عدم توحيد القياس بين إجراءات الاستخلاص

المستخدمة لتقييم نشاط مضادات الأكسدة، الأمر الذي يعوق المقارنة بين الدراسات ويتسبب بتفسيرات للنتائج غير صحيحة غالباً (Coulombier، وآخرون، 2021).

بعيداً عن الاختلاف بين الدراسات، فقد بات من المتفق عليه أن الطحلب المدروس غني بمركبات كيماوية هي مضادات للأكسدة، وهو بذلك مصدر طبيعي لهذه المركبات؛ مما يقدّم لاقتراح إدخاله مجال التصنيع الغذائي باستخدامه كمضاف غذائي طبيعي يطيل فترة صلاحية المنتج بسبب محتواه من مضادات الأكسدة، ويُضاف إلى ما سبق أثر ذلك المحتوى في تعزيز الوضع الصحي للبشر والحد من الإصابة بالمرض من خلال الحد من أنواع الأوكسجين التفاعلي Reactive Oxygyn Speciese ROS، إلا أن هذا الجانب لايزال ضمن دائرة اهتمام البحث العلمي لدراسة منهجية الامتصاص لهذه المركبات داخل الجسم (Wells، وآخرون، 2017؛ Coulombier، وآخرون، 2021).

3.2.3 تقدير الفيتامينات

كشف تقدير الفيتامينات وجود كلّ من الفيتامين B_{12} والفيتامين C في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس *C. vulgaris*، وهنا تجدر الإشارة إلى أن الفيتامين C أحد مضادات التأكسد في كتلة الطحالب الحيوية (Coulombier، وآخرون، 2021).

بلغ محتوى الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس 2.764± 0.121 µg/g من الفيتامين B_{12}، وبذلك تكون قد تفوقت على عدة دراسات سابقة تراوح فيها محتوى الفيتامين ضمن المجال 0.08–2.5 ng/g فقط من الوزن الجاف (Del Mondo، وآخرون، 2020)، حتى أن هذا المحتوى كان أعلى مما هو عليه في بعض منتجات الكلوريلا التجارية؛ من مثل مسحوق الكلوريلا 2.1 µg/g (Edelmann، وآخرون، 2019)، وكان أعلى بكثير عما هو عليه في دراسات بحثية أخرى وصل فيها حتى 43.1±15.3 µg100/g (Gelgor، وآخرون، 2022)، و 0.001 µg/g من الوزن الجاف (Maruyama، وآخرون، 1997)، إلا أنه بخلاف ذلك انخفض هذا المحتوى عما هو عليه في دراسة سابقة بلغ فيها 125.9 g100/mg مادة جافة (Alam & Mobin، 2017)، كذاك انخفض عما هو عليه في بعض منتجات الكلوريلا التجارية التي احتوت على 400 µg100/g على الأكثر من الوزن الجاف

(Bito، وآخرون، 2016)، أو حتى 500 µg100/g من الوزن الجاف (Bito، وآخرون، 2020)، أو وصل حتى 125.9 g100/mg (Panahi، وآخرون، 2012).

ومن المثير للاهتمام أن محتوى الفيتامين B_{12} في كتلة *C. vulgaris* الجافة يزيد عما هو عليه في كبد البقر والدجاج (نحو 25–53 µg100/g من الوزن الطازج) (Bito & Watanabe، 2018)، وفي ذوات الصدفتين الصالحة للأكل مثل المحار (نحو 60 µg100/g من الوزن الطازج) (Bito، وآخرون، 2018)؛ الأمر الذي يقدّم هذه الكتلة بديلاً عن المأكولات الحيوانية مقترحاً في الحمية النباتية كمصدر للفيتامين B_{12}.

من جهة ثانية، فقد كان محتوى الفيتامين C في الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس 914.583 ± 1.434 µg/g من الوزن الجاف، مما يتوافق مع دراسات سابقة تراوح فيها محتوى الفيتامين C في كتلة الطحلب ضمن المجال (0.1–15 g/mg) من الوزن الجاف (Del Mondo، وآخرون، 2020)، وهو يقارب التركيز 1000 µg/g من الوزن الجاف في دراسة أخرى (Maruyama، وآخرون، 1997)، إلا أن هذا المحتوى كان أعلى قيمة مما هو عليه في بعض المضغوطات التجارية للطحلب *C. vulgaris* ؛ إذ بلغ 15.6 g100/mg (Panahi، وآخرون، 2012)، وتراوح بين 7 و200 g100/mg (Bito، وآخرون، 2020)، ولم يتجاوز 4786.3±1763.2 µg100/g في أخرى (Gelgor، وآخرون، 2022)، ولكنه أقل من 50.7 g100/mg وزن جاف (Pratt & Johnson، 1967)، و15 µg/g وزن جاف (Aaronson، وآخرون، 1977). وبهذا فإن الكتلة الحيوية للطحلب تتفوق بمحتواها من الفيتامين C على بعض الفواكه الغنية بهذا الفيتامين؛ مثل الفريز أو الكيوي أو الليمون (0.54 و0.52 و0.42 g/mg وزن جاف على الترتيب (Szeto، وآخرون، 2002؛ Del Mondo، وآخرون، 2020).

تعود هذه الاختلافات في محتوى الكتلة الحيوية لطحلب *C. vulgaris* من الفيتامينات إلى اختلاف سلالة الطحلب واختلاف شروط النمو، مثل تركيب وسط النمو (Miller & Brown، 1992؛ Galasso، وآخرون، 2019) ومحتواه من المعادن الثقيلة (Strejckova، وآخرون، 2019)؛ حيث يرتبط تركيز الفيتامين B_{12} في الخلية ارتباطاً إيجابياً بتركيز معدن الكوبالت في الوسط (Jalilian، وآخرون، 2019)، ومثل طور النمو (Brown & Miller، 1992؛ Wells، وآخرون، 2017؛ Galasso، وآخرون، 2019؛ Del Mondo، وآخرون، 2020) وشدة

الضوء (Smerilli، وآخرون، 2017؛ 2019)، فعلى الرغم من أن استنزاف العناصر الغذائية في الوسط في نهاية طور النمو الأُسّي يعزّز تصنيع الفيتامين C عند النوع المدروس (Goiris، وآخرون، 2015)، إلا أن تصنيع هذا الفيتامين ينخفض في طور الثبات بسبب انخفاض الشدة الضوئية؛ وبمعنى آخر يقل تركيز الفيتامين بازدياد كثافة الخلايا (Johnson & Pratt، 1967؛ Bito، وآخرون، 2020)، وتجدر الإشارة إلى أن محتوى الفيتامين C يتباين بشدة خلال أطوار نمو الطحالب الدقيقة عموماً (Brown، وآخرون، 1999؛ Smerilli، وآخرون، 2017) لاحتمال ارتباط ذاك المحتوى بوظائف الفيتامين الحيوية الكيميائية في الخلية (Smerilli، وآخرون، 2017).

ولطرائق معالجة العينة؛ مثل التجفيف أو التجفيد وغيرها تأثير جليّ في تقييم محتوى الفيتامينات (Ling، وآخرون، 2015)، ويُضاف إليها التقنية المستخدمة في تحليل هذا المحتوى؛ فقد تعمل بعض التقنيات على المبالغة في تقدير محتوى بعض منتجات *Chlorella* من الفيتامين B_{12} بسبب احتواء الأخيرة على مركبات corinoid غير النشطة؛ مثل 5–ميتوكسي بنزيميدازوليل كوبأميد 5-methoxybenzimidazolylcobamide وكورينويد corrinoid الخالي من الكوبلت (Bito، وآخرون، 2020)؛ مما يتطلب استخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة مع كاشف مطياف الكتلة liquid chromatography–tandem mass spectrometry من أجل تقديرٍ أكبر دقة (Bito، وآخرون، 2016)، أما فيما يتعلق بتقدير الفيتامين C فيُضاف حمض الميتافوسفوريك (MPA) بغرض الاستخلاص والحفاظ على الثباتية (Annette & Graham، 1992)، إلا أنه يفقد فعاليته مع الوقت؛ مما يؤثر في النتيجة (Bertolo & Gennaro، 1990؛ Polesello & Rizzolo، 1992).

وهكذا، فإنه لا تزال تغيرات الفيتامين غير مفهومة وبحاجة إلى مزيد من البحث (Wells، وآخرون، 2017)، كما أن تنوع العوامل الحيوية والبيئية والتقنية المؤثرة في محتوى الفيتامين وتباينها يمكن أن يجعل المقارنات المباشرة بين الدراسات صعبة.

3.2.4 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية

بينت النتائج أن نسبة الرماد في الكتلة الحيوية الجافة للنوع *C. vulgaris* بلغت 10.9252%± 0.0043 تحت ظروف النمو المطبَّقة، وهي موافقة لنتائج عكو وزملائه (2017) حيث لم تقلّ عن 10.56%، ولكنها أقل من

النسب التي حصل عليها كل من Badaway (2005) وBi وHe (2013) وWu وزملاؤه (2012) وFradique وزملاؤه (2010) في دراستهم للنوع نفسه 17.5%، 14.3%، 20%، 34%، على الترتيب، وأعلى مما حصل عليه Mohamed وزملاؤه (2013) وsamek وزملاؤه (2013) وLiu (2017) 9.5%، 4.8%، 7.9%، على الترتيب. ويعود الاختلاف عن هذه النسب إلى الاختلاف ضمن النوع من جهة، وفي ظروف النمو من جهة ثانية؛ التي هي المصدر الرئيس للاختلافات في محتويات المعادن حتى للسلالة الواحدة من الطحالب (He & Bi، 2013؛ Wells، وآخرون، 2017).

أما فيما يتعلق بمحتوى الرماد من بعض العناصر المعدنية في النوع *C. vulgaris* فقد بينت النتائج ارتفاع نسب هذه العناصر المغذية في رماد هذا الطحلب، وهذا يتفق مع Wang وزملائه (2012) من حيث غنى الطحالب الخضراء الدقيقة عموماً بهذه المعادن. كذلك لوحظ ارتفاع نسبة البوتاسيوم من العناصر الكبرى (9541.300±195.403 ppm) مقارنة بالفوسفور (5179.133±64.071 ppm)، وهذا يتفق مع ما أشار إليه Bi وHe (2013) من أن البوتاسيوم هو العنصر الأعلى نسبة في رماد الطحالب الخضراء الدقيقة، وكذلك في رماد النوع *C. vulgaris* (Maruyama، وآخرون، 1997؛ Yusof، وآخرون، 2011؛ Panahi، وآخرون، 2015)؛ الأمر الذي يقدِّم هذا الطحلب كمصدر جيد للبوتاسيوم. أما العناصر الصِّغرية microelements فقد ارتفعت نسبة الحديد (1838.021±171.341 ppm) مقارنة بالنحاس (221.401±21.099 ppm) والمنغنيز (124.343±2.115 ppm)؛ الأمر الذي ينسجم مع نتائج الدراسات السابقة في تفوق الحديد ضمن العناصر الصغرى في رماد الطحالب الخضراء الدقيقة (He & Bi، 2013)، وفي رماد النوع المدروس ذاته (Maruyama، وآخرون، 1997؛ Panahi، وآخرون، 2015؛ Liu، 2017؛ عكّو وآخرون، 2017)؛ لذلك، فإن الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* قادرة على تعزيز محتوى المعادن للأغذية التقليدية، والتأثير إيجاباً في صحة البشر (Mohamed، وآخرون، 2013).

أما مقارنة نتائج هذه الدراسة بما حصل عليه عكّو وزملاؤه (2017) في دراستهم للنوع المدروس (الجدول 3) فقد لوحظ خروج نتائج هذه الدراسة عن حدود مجالات عكو وزملائه (2017) نقصاناً كالفوسفور، أو زيادةً

كالبوتاسيوم والمنغنيز والنحاس، باستثناء الحديد، ويعود هذا الخلاف إلى اختلاف يوم الحصاد. بصورة عامة، تباينت نسب العناصر فيما بينها زيادة ونقصاناً مقارنة بالدراسات السابقة (Maruyama، وآخرون، 1997؛ Panahi، وآخرون، 2015؛ 2012؛ Liu، 2017)، ويبقى هذا التباين بلا تفسير؛ فالعلاقة بين كميات العناصر المعدنية الأساسية المغذية والتغيرات الاستقلابية التي تحدث في الخلية واحدة من أكثر المجالات الأساسية في الفيزيولوجيا والكيمياء الحيوية التي لاتزال غير واضحة تماماً (Mishra، وآخرون، 2012).

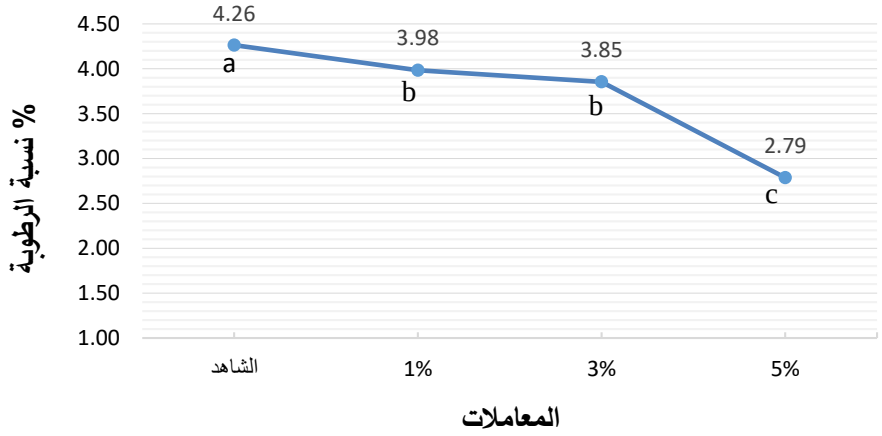
3.3 التحليل الكيميائي لمعاملات تدعيم البسكويت

3.3.1 تقدير الرطوبة

تباينت نسبة الرطوبة في معاملات البسكويت من 2.79%±0.02 إلى 4.26%±0.041، وهذه النسبة تتوافق مع هذا النوع من الأغذية؛ منخفض الرطوبة عادةً (Faridi، وآخرون، 1994، ص:160)، فهو مستحلب صلب من السكروز والدهون والنشا غير الهلامي وفقاً للجمعية الأمريكية لعلماء الحبوب (Hoseney، وآخرون، 1988)، ولا تزيد نسبة رطوبته على 10% (Norhayati، وآخرون، 2015؛ Batista، وآخرون، 2017).

يُلاحظ من الشكل 12، تناقُص محتوى الرطوبة في البسكويت مع زيادة نسبة الطحلب المضاف، وهذا يتفق مع آخرين (Batista، وآخرون، 2017؛ Uribe-Wandurraga، وآخرون، 2020) إذ تناقصت نسبة الرطوبة من 5.0 إلى 3.2% عند إضافة الطحلب *C. vulgaris* إلى البسكويت بنسبة 2% و6%، على التوالي. يمكن أن يعود ذلك إلى أن بروتين الطحالب الدقيقة وجزيئات الكربوهيدرات فيها لها أثر ملموس في عملية امتصاص الماء (Gouveia، وآخرون، 2007؛ Uribe-Wandurraga، وآخرون، 2021)، وعند إضافة الطحالب الدقيقة إلى عجينة البسكويت، فإنها تمتص المزيد من الماء؛ الأمر الذي يعزز بدوره الهيكل الداخلي للبسكويت ويزيد تماسكه ككل (Gouveia، وآخرون، 2007؛ Batista، وآخرون، 2017؛ Uribe-Wandurraga، وآخرون، 2021)، ويقلّل النشاط المائي؛ مما يخفّض التكاثر الميكروبي (Batista، وآخرون، 2017) ويطيل فترة االتخزين (Aramouni & Abu-Ghoush، 2011). في ظل ظروف التصنيع التجاري، يُطلب تخفيض كمية الماء المضاف إلى العجين

لتسهيل إخراجه من القالب الدوار (Boobier، وآخرون، 2006)، وهكذا، فإن خفض الترطيب المطلوب لبروتينات الدقيق بإضافة الكتلة الحيوية للطحلب يسهّل الناحية العملية مع الحفاظ على مستويات الرطوبة المطلوبة للمنتج.



الشكل 12. تغير نسبة الرطوبة في معاملات البسكويت؛ ($^{a, b, c}$) الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي عند مستوى ثقة 99%.

ويمكن أن تكون إضافة كتلة الطحلب –والحال كذلك– بديلاً مناسباً عن الإضافات الغنية بالبروتين الأخرى؛ بروتين الصويا المعزول وبروتين المصل المركّز ودقيق الحمّص، التي سببت خفض امتصاص العجين للماء من 62.3 إلى 43.7%، لأن مقدرتها على ربط الماء أقل من تلك لبروتين الغلوتين؛ مما أخّر سيرورة الترطيب وتطور الغلوتين (Darappa & Rawat، 2015). أي يمكن تقديم كتلة الطحلب كمدعم غذائي غني بالبروتين دون خسارة ترطيب المنتج في الوقت ذاته؛ الأمر الذي ينعكس إيجاباً ليس على نعومة المنتج وإنتاجيته فقط، بل على مدة صلاحيته كذلك (Csiro، 2011، ص: 278)، فقد تبيّن أن الطحلب *C. vulgaris* يمكن أن يكون مفيداً لتقليل فقد الرطوبة والحفاظ على نضارة المنتج وشعور الفم بالرطوبة للمنتجات الغذائية، ولاسيما المخبوزات منها (Lafarga، وآخرون، 2019). ويُعتقد أنه ليس للبروتينات وحدها هذا التأثير بل تشاركها مكوناتٍ أخرى مشاركةً كبيرةً مثل السكريات (Acquah، وآخرون، 2021، ص:112).

3.3.2 تقدير البروتين

يبيّن الجدول 14 نتائج تقدير البروتين الكلي للعينات بواقع ثلاث مكررات عند مستوى ثقة 99%. تراوح محتوى البسكويت المدعَّم من البروتين بين 5.68% و6.5%، وهي نسب تنسجم مع النسبتين 5.9% و8% من الوزن

الجاف للبسكويت المدعّم بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* بنسبة 2% و6%، على التوالي (Batista، وآخرون، 2017). كذلك، يكشف الجدول 14 ازدياد النسبة المئوية للبروتين بزيادة نسبة إضافة الطحلب، أي إن إضافة الكتلة الحيوية للطحلب إلى البسكويت تعمل على زيادة نسبة البروتين فيه (Batista، وآخرون، 2017). كانت الزيادة معنوية مع النسبتين 3% و5% مقارنة بالشاهد ($P<0.05$)؛ الأمر الذي توافق مع ما ورد في دراسة Batista وزملائها (2017) بأن الزيادة المعنوية في نسبة البروتين ترافقت مع إضافة الطحالب إلى البسكويت بنسبة 6%، ولم تحقق الإضافة 2% هذه الزيادة.

الجدول 14. النسبة المئوية لمحتوى البروتين في كل من البسكويت الشاهد والمدعّم (المتوسط±SD)، والنسبة المئوية لما يغطيه 100 g من البسكويت اعتماداً على الاحتياج اليومي للبروتين حسب FDA

العينة	محتوى البروتين (g100/g)	النسبة المئوية لما يغطيه g100 بسكويت من الاحتياج اليومي من البروتين (g50 /يوم)
الشاهد	0.216288 ± 5.68327^{a}	11.36654
%1	0.107231 ± 5.75393^{a}	11.50786
%3	0.011258 ± 6.30130^{b}	12.6026
%5	0.053949 ± 6.52237^{b}	13.04474

($^{a, b}$) الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تشير لعدم وجود فرق معنوي عند مستوى ثقة 99%.

لقد اختلف محتوى البروتين في معاملات البسكويت المدعّم كافة عما هو عليه في أنواع البسكويت الأخرى التي تحتوي على نسبة عالية من البروتين؛ مثل بسكويت دقيق الشوفان 8.73%، البسكويت المقرمش بنكهة الخضار 8.83% وبسكويت الحبوب الكاملة 9.92 % (Norhayati، وآخرون، 2015)، مما يعني زيادة الحصة الغذائية من هذا البسكويت مرة ونصف عما هي عليه مما سبق من الأنواع المذكورة؛ أي 90 g بدلاً من 60 g لمقاربة كمية البروتين المستهلكة مع تلك التي يمكن استهلاكها بتناول كلٍ من مقرمشات بسكويت دقيق الشوفان أو نكهة الخضار أو القمح الكامل (5.24 و5.30 و5.95 g بروتين على الترتيب) (Norhayati، وآخرون، 2015). إلا أن هذه الأنواع من البسكويت هي في حقيقتها منتجات غذائية تجارية تُباع في الأسواق، ومن المحتمل أن يعود محتواها هذا من البروتين إلى وجود إضافات تعزّز القيمة الغذائية وتحسّن الصفات الحسية.

وبطريقةٍ أخرى، أدت إضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgari* إلى البسكويت بنسبة 3% و5% إلى زيادة محتوى البروتين عن الشاهد زيادةً معنويةً بنسبة 11% و15%، على التوالي. وهي أقل من 20%؛ الزيادة

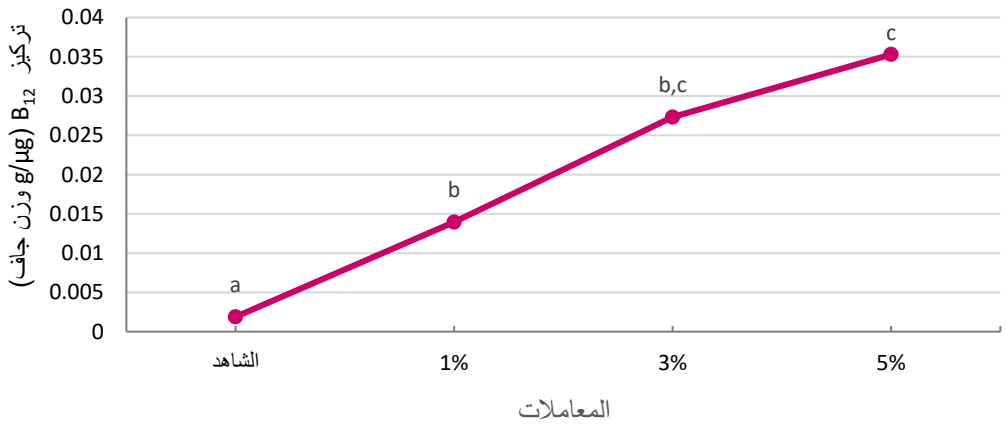
التي حققها التدعيم 5% للبسكويت بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب *Arthrospira platensis* المعروف باسم سبيرولينا والأكثر غنىً بالبروتين (Bolanho، وآخرون، 2014). كما أن هذه الزيادة في محتوى البروتين هي أقلّ بكثير من تلك التي حققتها إضافة الذرة السكرية أو حتى الحشرات كالنمل الأبيض إلى البسكويت، إذ كان محتوى البروتين مرتفعاً على نحوٍ ملحوظ في جميع معاملات البسكويت المدعَّمة وتراوح من 36.4% إلى 41.0% مقارنةً بمحتوى الشاهد (10.5% بروتين)، ولكن لا بدّ من التصريح بأن هذه الزيادة الكبيرة في محتوى البروتين قد ترافقت مع نسبة تدعيم هي أضعاف نسب التدعيم في هذا العمل أيضاً التي بلغت حتى 60% (Awobusuyi، وآخرون، 2020)، كما أن هذه الدراسات قد أغفلت تقييم الجانب الحسي للمنتج المدعّم خاصتها.

أُجريت مقارنة محتوى البسكويت المدعّم من البروتين المقدّر بذلك المتوقَّع جرّاء إضافة كتلة الطحلب الحيوية الجافة إلى الوصفة، وقد بيّن اختبار Student's test T أن المحتوى المقدَّر لا يختلف إحصائياً عن ذلك المتوقَّع ($p>0.01$)، وهذا يتوافق مع نتائج Gelgor وزملائه في احتفاظ *C. vulgaris* بمحتواها من البروتين وعدم تأثره كمياً بعملية الخَبز (125°م مدة 15 دقيقة) (Gelgor، وآخرون، 2022).

3.3.3 تقدير الفيتامينات

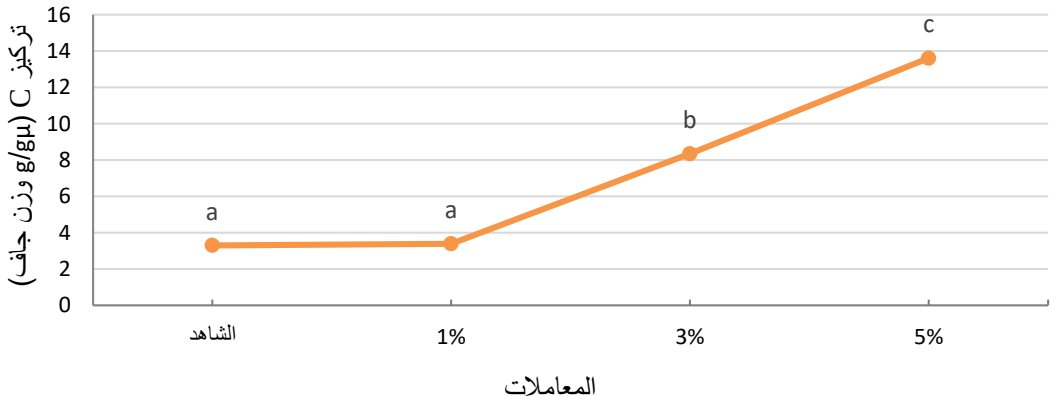
أظهرت النتائج وجود كل من الفيتامين B_{12} والفيتامين C في جميع معاملات البسكويت، وقد ازداد محتواهما بزيادة نسبة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب المضافة، وبيّن اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه One Way ANOVA وجود فرق معنوي بين المعاملات ($p<0.01$) في محتوى كل من الفيتامينات B_{12} وC أيضاً.

كشف اختبار Tukey HSDa أن البسكويت المدعّم بكتلة الطحلب الجافة قد تفوق معنوياً على الشاهد (0.00189± 0.00057 g/µg وزن جاف) في محتوى الفيتامين B_{12} في الوزن الجاف، بينما انحصر الفرق المعنوي ضمن معاملات التدعيم بين كل من التدعيم 1% (0.014± 0.0012 g/µg) والتدعيم 5% (0.035±0.0024 g/µg) فقط، إذ لم يكن من فرق معنوي بين كل منهما والتدعيم 3% (0.027±0.0082 g/µg)، الشكل 13.



الشكل 13. تغير تركيز الفيتامين B_{12} بإضافة كتلة الطحلب في معاملات البسكويت؛ ($^{a, b, c}$) الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي عند مستوى ثقة 99%.

في سياق آخر، أظهر اختبار Tukey HSDa أيضاً وجود فرق معنوي بين معاملات التدعيم كافة؛ 1%، 3%، 5%، مثنىً مثنىً، في محتواها من الفيتامين C البالغ 0.042±3.391، 0.256±8.347، 0.468±13.605 µg/g من الوزن الجاف، على الترتيب، فيما اقتصر الفرق المعنوي بينها والشاهد (0.419±3.3 µg/g وزن جاف) على كل من التدعيم 3% و5% دوناً عن التدعيم 1%، الشكل 14.



الشكل 14. تغير تركيز الفيتامين C بإضافة كتلة الطحلب في معاملات البسكويت؛ ($^{a, b, c}$) الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي عند مستوى ثقة 99%.

إجمالاً، أظهرت النتائج أن الكتلة الحيوية المضافة من الطحلب إلى عجين البسكويت قد عملت على زيادة المحتوى من الفيتامينات المقدرة، أي إن عملية الخَبْز لم تؤثر سلبياً في هذه الفيتامينات، وهذا يتفق مع ما ذكره Gelgor وزملاؤه (2022) في أن الفيتامينات القابلة للذوبان في الماء في الكتلة الحيوية لهذا الطحلب لم تتأثر بالحرارة 125 درجة مئوية مدة 15 دقيقة، ويمكن أن يُردّ ذلك إلى صلابة جدار خلايا الطحلب الذي يغلف العناصر

الغذائية داخلها؛ الأمر الذي يرشّح كتلة الطحلب *C. vulgaris* لتكون مدعّماً غذائياً يُضاف إلى وصفات الطعام مع إمكان الخَبْز فترات قصيرة الأمد دون فقدان قيمته الغذائية من هذه الفيتامينات.

يبين الجدول 15 أيضاً أن استهلاك البسكويت المدعّم (3%، 5%) يمكن أن يسدّ ما لا يقلّ عن ضعف ما يغطيه استهلاك الشاهد من الاحتياج اليومي الموصى به من الفيتامين C. ليس ذلك فقط، بل بالنظر إلى غنى البسكويت المدعم بالفيتامين B_{12}، وأن الاحتياج اليومي الموصى به من الفيتامين B_{12} هو 6 gµ فقط حسب FDA، وأن الحد الأدنى من المتطلبات اليومية لهذا الفيتامين لا يتجاوز 2.4 gµ وفقاً لبيانات وزارة الصحة في الولايات المتحدة الأمريكية (HHS، 2015)، فإنه يمكن أن يوفر البسكويت المدعم مصدراً بديلاً لهذا الفيتامين عند من يتبعون نظاماً غذائياً نباتياً.

الجدول 15. النسبة المئوية لما يغطيه 100g بسكويت من الفيتامين B_{12}، C من الاحتياج اليومي حسب FDA.

العينة	**النسبة المئوية لما يغطيه 100g بسكويت من الاحتياج اليومي**	
	الفيتامين B_{12} (gµ 6=RDA)*	الفيتامين C (mg 60=RDA)*
الشاهد	3.15	0.55
%1	23.24	0.57
%3	45.51	1.39
%5	58.81	2.27
الطحلب	4606.92	152.43

*: القيم اليومية هي كميات العناصر الغذائية الموصى بها يوميًا للأمريكيين الذين تبلغ أعمارهم 4 سنوات أو أكثر.

3.3.4 تقدير الرماد وبعض العناصر المعدنية

أظهرت النتائج المبينة في الجدول 16 ازدياد نسبة الرماد بزيادة نسبة إضافة الطحلب، وكانت الزيادة معنوية مع النسبتين 3% و5% مقارنة بالشاهد، ولكن نسب الرماد هذه كانت أقل مما حصلت عليه Batista وزملاؤها (2017) لبسكويت مدعم بذات نوع الطحلب ولكن بنسبة 2% و6% (2.3%±0.1، 2.6%±0.1، على التوالي)، ويمكن أن يُعزى ذلك إلى اختلاف المواد الأولية المستخدمة في تحضير البسكويت وإعداده، علاوة على اختلاف النوع وظروف التنمية والاستحصال.

كذلك، فإنّ إضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحالب إلى البسكويت بنسبة 1% لم تؤدِّ إلى حدوث أي فرق معنوي في نسب المعادن المقدّرة عدا الحديد، بينما أصبح الفرق معنوياً عند الإضافة 3% و5% لجميع المعادن المقدّرة من جهة، مع وجود فروق معنوية بين الأخيرتين لهذه المعادن من جهة ثانية؛ مما يقترح إضافة الكتلة الحيوية للطحلب بنسبة تزيد على 1% على الأقل للحصول على التدعيم.

الجدول 16. النسبة المئوية للرماد وتركيز بعض المعادن في كلٍّ من البسكويت الشاهد والمدعَّم.

	تركيز العناصر المعدنية ± SD (ppm)				
العينة	**الشاهد**	**1%**	**3%**	**5%**
الرماد	0.0043±0.5494[a]	0.0059±0.5516 [a]	0.0191±0.6403[b]	0.0228±0.7581[c]
K	5.8637 ±924.0543 [a]	8.9685±949.7403[a]	6.2750±1075.8071[b]	26.1900±1156.4609[c]
Fe	0.2375±7.9495 [a]	0.4860±17.9537[b]	0.8115±40.1775[c]	4.8625±63.9955[d]
Mn	0.5315±3.7815 [a]	0.5285±3.8215[a]	0.2340±5.7293[b]	0.07500±7.0273[c]
Cu	0.0745±1.5815 [a]	0.0135±2.9175[a]	0.8355±6.8275[b]	0.2445±9.4035[c]
P	11.4524±348.2145 [a]	15.0468±436.2447[a]	26.7238±610.6053[b]	53.9472±834.8744[c]

([a, b, c, d]) الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد تشير لعدم وجود فرق معنوي عند مستوى ثقة 99%.

أما فيما يتعلق بتأثير إضافة الطحلب إلى وصفة البسكويت (الجدول 17)، فقد أدى تدعيم البسكويت بنسبة 3% إلى زيادة البوتاسيوم بنسبة 16.4% والحديد بنسبة 405.4% والمنغنيز بنسبة 51.5% والنحاس بنسبة 331.7% والفوسفور بنسبة 75% على الشاهد، وأدى التدعيم بنسبة 5% إلى زيادة نسبة البوتاسيوم والحديد والمنغنيز والنحاس والفوسفور بنسبة 25.15%، 705%، 85.8%، 494.6%، 139.8%، على الترتيب؛ الأمر الذي من شأنه أن يشجّع استخدام الكتلة الحيوية للطحلب كمضافٍ غذائي لتدعيم المحتوى المعدني.

الجدول 17. النسبة المئوية لما يغطيه 100g من البسكويت اعتماداً على الاحتياج اليومي للمعادن حسب FDA، والنسبة المئوية للفرق بين البسكويت المدعم والشاهد.

المعدن	**النسبة المئوية لما يغطيه 100g بسكويت من الاحتياج اليومي**				**النسبة المئوية للفرق بين البسكويت المدعم والشاهد**	
	الشاهد	**1%**	**3%**	**5%**	**3%**	**5%**
K	2.64	2.71	3.08	3.30	16.42	25.15
Fe	4.42	9.97	22.32	35.55	405.41	705.03
Mn	18.91	19.11	28.65	35.14	51.51	85.83
Cu	7.91	14.59	34.14	47.02	331.71	494.59
P	3.48	4.36	6.11	8.35	75.35	139.76

*: القيم اليومية هي كميات العناصر الغذائية الموصى بها يوميًا للأمريكيين الذين تبلغ أعمارهم 4 سنوات أو أكثر.

لوحظ عند مقارنة محتوى البسكويت من العناصر المعدنية بالحاجة اليومية لهذه العناصر وفق FDA (الجدول 17) أن 100g من البسكويت المدعم بنسبة 3% أو 5% (الاستهلاك اليومي للطحالب بما لا يزيد على 20 g، لا يشكّل أي آثار جانبية ضارة، حتى مع الاستعمال المديد (Becker، 1988)) يمكن أن تغطي معظم الحاجة اليومية من الحديد والمنغنيز والنحاس. يزيد على ذلك، أنه حتى التدعيم بنسبة 1% فقط يمكن له أن يكفي نحو 10% من حاجة الجسم اليومية للحديد؛ العنصر الذي يشكل قلقاً تغذوياً للبشر على مستوى العالم أجمع يطال الأطفال الصغار، والنسوة، والحوامل منهن على وجه الخصوص حسب FDA (FDA، 2019) ومنظمة الغذاء (FAO، 2004). بالإضافة إلى تعزيز محتوى الحديد الكلي في الغذاء، يمكن أن تعمل الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* على نحوٍ تآزري لتسهيل امتصاص الحديد من الغذاء بسبب المستويات العالية لفيتامين C الذي يحول الحديد إلى الشكل الحديدي الأسهل امتصاصاً بشكل كبير (Wells، وآخرون، 2017).

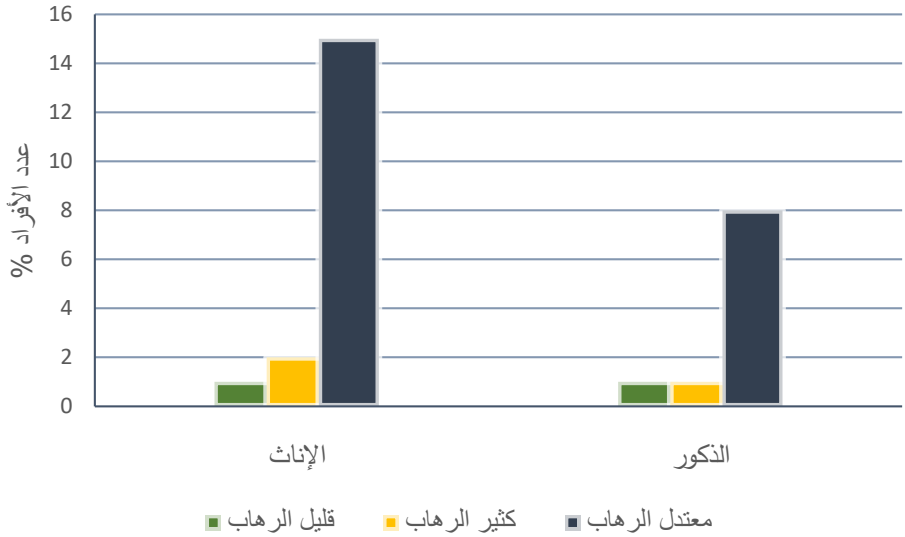
من كل ما سبق، يظهر أن إضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* وسيلة ناجحة لتدعيم محتوى البسكويت من البوتاسيوم والحديد؛ وهي العناصر التي أولتها منظمة FDA أهمية خاصة بسبب المعاناة جراء نقصها على مستوى العالم (FDA، 2019). وهذا يُبرز أهمية هذا النوع من التدعيم الذي يمكن أن يكون له دور فعال في تحسين النشاطات الحيوية الأساسية التي تحدث في جسم الإنسان.

3.4 الاختبار الحسي

3.4.1 تقييم مستوى الرهاب من الغذاء الجديد FNS

كشفت نتائج تحليل استبانة الرهاب من الغذاء الجديد (الشكل 15)، أن 82.14% من المشاركين في الاختبار الحسي كانوا معتدلين في رهابهم من الغذاء الجديد (65.2% إناث، 34.8% ذكور)، و10.72% يعانون الرهاب (66.7% إناث، 33.3% ذكور)، بينما 7.14% منهم هم من ضعيفي الرهاب (50% إناث، 50% ذكور)، ويمكن أن يُعزى ذلك إلى أن المشاركين كافة هم من مستوى تعليمي مرتفع (46.43% يحملون شهادة الدكتوراه،21.43% طلبة دراسات عليا ومثلهم من خريجي المعاهد المتوسطة،10.71% من حملة الإجازات الجامعية)، إذ يرتبط انخفاض مستوى الرهاب بارتفاع المستوى التعليمي (Meiselman، وآخرون، 2010؛ Soucier، وآخرون، 2019؛

Hazley، وآخرون، 2022)، ويُضاف إلى ذلك تأثير الفئة العمرية التي ينتمي لها جميع المشاركين (20–54≥ عاماً)، إذ ينخفض رهاب الطعام الجديد عند البالغين عما هو عند الأطفال ويبقى مستقراً مع تقدم العمر إلى أن يزداد بعد سنّ 54 عاماً في دراسة تناولت 3246 شخصاً بعمر من سنة واحدة إلى 87 عاماً (Hazley، وآخرون، 2022).



الشكل 15. توزع المشاركين في الاختبار الحسي وفقاً لجنس الفرد وحالة الرهاب من الغذاء الجديد.

3.4.2 دراسة الارتبـــاط بين مستوى الرهاب من الغذاء الجديد FNS والعمر والجنس

أظهر التحليل الإحصائي ارتباطاً ضعيفاً وغير معنوي بين مستوى الرهاب والجنس (r_s =0.062, P> 0.05)؛ الأمر الذي توافق مع عديدٍ من الدراسات ذكرت عدم وجود علاقة معنوية بين الرهاب والجنس (Meiselman، وآخرون، 2010؛ Heuvel، وآخرون، 2019؛ Zhao، وآخرون، 2020؛ Chen & Tian، 2021؛ Okumus، وآخرون، 2021).

أما من ناحية العمر، فإن الارتبـاط الضـعيف وغير المعنوي أيضاً بين مسـتوى الرهـاب والفئـة العمـرية (r_s = -0.171, *P*> 0.05)، (τ = -0.094, -0.156, *P*> 0.05) قد خالف الدراسات السابقة التي ذكرت ازدياد الرهاب مع تقدم العمر عند البالغين (Meiselman، وآخرون، 2010؛ Muhammad، وآخرون، 2015؛ Heuvel، وآخرون، 2019؛ Predieri، وآخرون، 2020)، وكان على توافق مع دراساتٍ أخرى لم تُظهر وجود أي علاقة

بين العمر والرهاب من الغذاء لدى البالغين (Stratton، وآخرون، 2015؛ Jaeger، وآخرون، 2017؛ Okumus، وآخرون، 2021).

إنّ جميع المشاركين تراوحت أعمارهم بين 23–70 عاماً؛ أي ينتمون إلى الفئة االعمرية التي تستقر فيها حالة الرهاب؛ فالمستهلكون الصغار، أطفالاً ومراهقين، وكبار السن أكثر رهاباً من أولئك الناضجين، مع وجود أشخاص يعانون من مستويات عالية من الرهاب في جميع الأعمار (Hazley، وآخرون، 2022)، وهذا من شأنه أن يفسّر عدم وجود علاقة الارتباط. وهنا تجدر الإشارة إلى صعوبة العثور على استنتاجات ثابتة لعلاقة العمر بالرهاب من الطعام الجديد، فقد أُجريت الدراسات في سنوات مختلفة، ودول مختلفة، وقطاعات استهلاكية مختلفة، الأمر الذي أدى إلى تباين كبير في نتائج الدراسات، مع محاولة تحديد بعض الاتجاهات العامة (Rabadán، وآخرون، 2021). فضلاً عن عدم توحيد الفئات العمرية التي يتم مقارنتها بين الدراسات.

3.4.3 دراسة تأثير الجنس والعمر ومستوى الرهاب من الغذاء الجديد FNS في التقييم الحسي

لم تتوزع بيانات المعايير الحسية توزعاً طبيعياً، فجرى تطبيق الاختبارت اللامَعْلَمِية nonparametric tests لدراسة دلالة الفروق في قيم كل معيار حسي على حدة للمعاملات كافة، وفي قيم متوسط تقييم لكل معاملة؛ اختبار Mann-Whitney U بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث، واختبار Kruskal-Wallis بين مجموعات الفئات العمرية ومجموعات مستويات الرهاب، عند مستوى الثقة 95%.

أظهر اختبار Mann-Whitney U لدراسة دلالة الفروق الثنائية عدم اختلاف الذكور عن الإناث في تقييم معاملات البسكويت حسياً؛ سواء في تقييمهم كل معيار حسي على حدة للمعاملات كافة، أو في قيم متوسط تقييم لكل معاملة؛ إذ لم تكن الفروق ذات دلالة إحصائية في قيم تقييم كل معيار حسي بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث ($P> 0.05$)، وكذلك الفروق في قيم متوسط تقييم لكل معاملة بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث من الذوّاقة ($P> 0.05$).

وكذلك لم يُظهر اختبار Kruskal-Wallis وجود فروقٍ معنوية ($P> 0.05$) عند تقييم المعايير الحسية لمعاملات البسكويت وعند تقييم متوسط تقييم هذه المعاملات، بين أي من الفئات العمرية الثلاثة (20–35، 36–45، ≤46 عاماً) أو بين مجموعات مستوى الرهاب (قليل الرهاب، معتدل الرهاب، كثير الرهاب) سواءً بسواء.

3.4.4 دراسة الفروق بين معاملات البسكويت حسياً

يبين الجدول 18 نتائج متوسط تقييم معاملات البسكويت لجميع المشاركين في الاختبار الحسي (عدد=28).

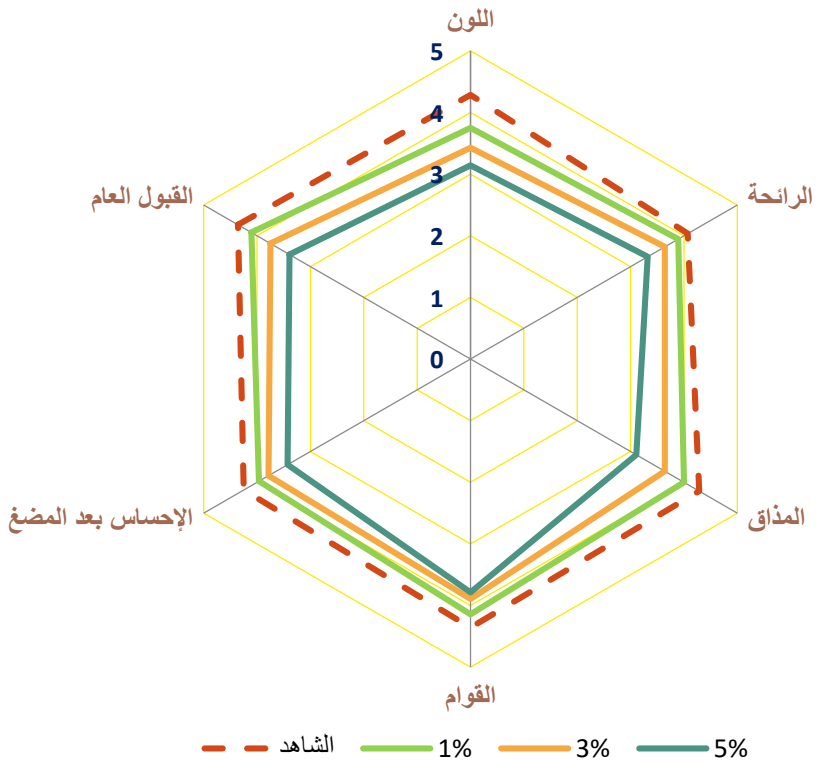
الجدول 18. متوسط درجات تقييم معاملات البسكويت وفق المعايير الحسية (من أصل 5) للمشاركين في الاختبار الحسي (عدد=28) وفقاً لجميع المعايير في الاختبار.

البسكويت الشاهد	البسكويت 1%	البسكويت 3%	البسكويت 5%
4.17	3.67	3.83	3.33
5	5	3.83	3.33
5	5	3.83	3.17
4	4.5	4.83	3.67
4	4.83	3.33	3.33
4	4	3.67	3
3.83	3.67	2.67	2.17
5	4	3.67	3.67
4	2.83	2.33	1.83
4.83	3.5	3.67	2
4.17	4	3.67	4
4	3.67	3.4	3
4	3.83	4	2.83
2.83	3.2	4	4.17
3.83	3.67	4	4
4.33	4	3.17	3.33
4.17	3.5	3	2.5
4	3.83	3.67	2.17
5	4	3.5	4
4.83	4.67	4.33	4.83
4.67	4.33	3	4
4	3.67	3.5	3.17
3.5	3.67	3.67	4.17
4.83	4	4	3.5
4.33	4.33	5	4.5
4	3.83	3.83	3.33
4.33	3.83	3.83	4.17
5	4.83	4.67	3

أظهر تحليل النتائج باستخدام اختبار Kruskal-Wallis عند مستوى الثقة 95% وجود فروق ذات دلالة إحصائية ($p<0.05$) في درجات تقييم المعايير الحسية بين اثنتين على الأقل من معاملات البسكويت الأربعة كافة (البسكويت الشاهد، البسكويت المدعّم بالكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* بالنسب: 1%، 3%، 5%)، ولمعرفة أي المعاملات تختلف جوهرياً عن الأخريات أُجري اختبار Mann-Whitney U بين كل شفع من المعاملات الأربعة للبسكويت.

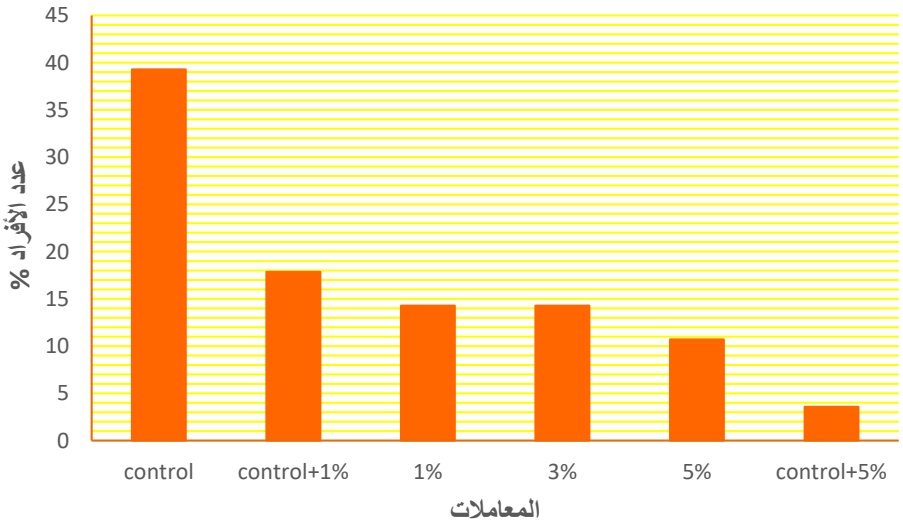
أظهرت نتائج تحليل الفروق الثنائية بين المعاملات وجود فرق معنوي بين الشاهد وجميع معاملات التدعيم، وكان الأكثر قبولاً، يليه التدعيم 1% ثم التدعيم 3% ثم التدعيم 5%، وبفرق معنوي بين الأخير والتدعيم 1%، وكان الفرق بين التدعيم 5% والشاهد يعود إلى الفرق في جميع المعايير الحسية التي أمكن تقييمها في الاختبار الحسي، انحصر الفرق بينه والتدعيم 3% على كلٍ من اللون والمذاق والقوام، واقتصر الفرق بينه والتدعيم 1% على الفرق في اللون فقط. يُلاحظ من هذه النتائج أن اللون كان المعيار الحسي ذا التاثير المعنوي بين معاملات التدعيم الثلاثة والشاهد؛ الأمر الذي يشير إلى لون الطعام كأهم إشارة حسية جوهرية للمنتج، لأنه يتحكم في الأحاسيس وتوقعات المتعة التي تحدد قبول المستهلك للمنتجات المخبوزة (Gouveia، وآخرون، 2007؛ Casales-Garcia، وآخرون، 2020).

يبين الشكل 16 متوسط درجات تقييم معايير الاختبار الحسي للبسكويت المدعَّم والشاهد بمشاركة 28 فرداً. عموماً، يمكن ملاحظة أن متوسط الصفات الحسية المختبرة بلغ –بحدٍ أقصى– القيمة 4.4، وهي ما تقابل المقياس "أحببته"، أما في حده الأدنى فلم يتعدَ القيمة 3 التي تقابل المقياس "حيادي" ولم يبلغ حد الرفض النهائي أو حتى حد الرفض؛ الأمر الذي يشير إلى عدم الاستياء من وجود الطحالب في البسكويت وكذلك إلى استحسانه عموماً. وعلى غرار هذه النتائج، ذكرت Batista وزملاؤها (2017) أن نتائج الاختبار الحسي للبسكويت المدعَّم بمستويات مختلفة (2%، 6%) من الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* كانت تقابل المقياسين "ما أحببته" و"أحببته" للتدعيم 6% و2%، على الترتيب، بسبب اللون غير المقبول الذي منحته كتلة الطحلب الخضراء للتدعيم 6% (Batista، وآخرون، 2017).



الشكل 16. نتائج الاختبار الحسي لمجموع 28 مشاركاً، 1: لم أحبه أبداً، 2: ما أحببته، 3: حيادي، 4: أحببته، 5: أحببته كثيراً.

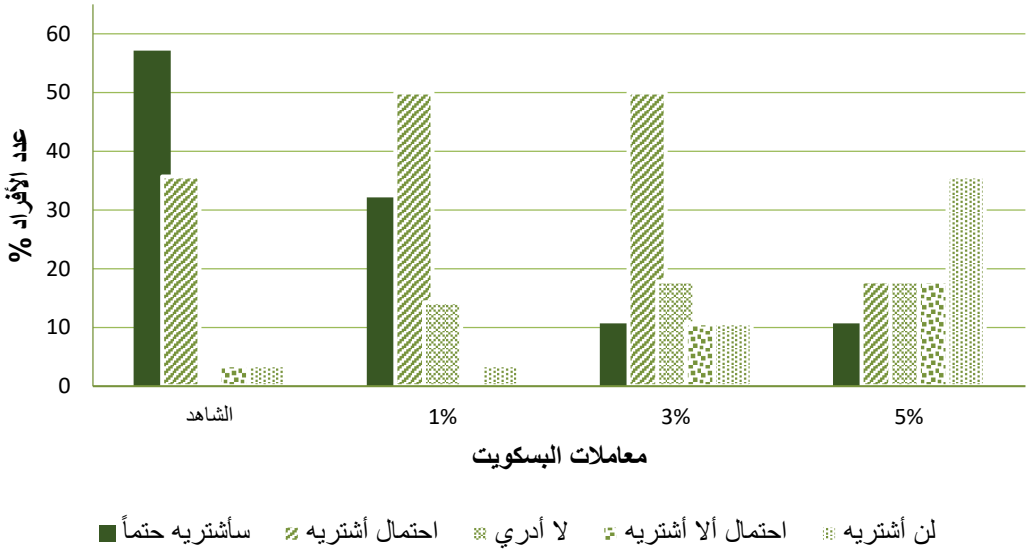
من جهة ثانية، أجمع 61% من المشاركين في الاختبار، من خلال التعليق في استبانة الاختبار الحسي، الشكل 17، على أفضلية الشاهد لصفاته المألوفة لديهم، ونصفهم تقريباً (32%) على أفضلية التدعيم 1% بسبب مقاربته للشاهد في صفاته الحسية؛ إذ جمع 18% منهم الشاهد مع التدعيم 1% عند تحديدهم للمنتج الأفضل، فقد خمَّنوا أن درجة تغييره عن الشاهد كانت معتدلة ومقبولة. بالمقابل، نال التدعيم 3% أفضلية 14% من المشاركين لأنه أكثر توازناً في صفاته الحسية بين المألوف والغريب، ومثلها كانت نسبة 14% من نصيب التدعيم 5% بسبب لونه اللافت على حد تعبيرهم، وطعمه الفريد. خلافاً لذلك، أشار 18% من المشاركين إلى استيائهم من اللون الداكن للغاية للتدعيم 5%، ومثلهم من الرائحة، وعلّق 43% من المشاركين أن له طعماً غريباً غير مستساغ، وهنا تجدر الإشارة إلى أن الشاهد قد نال نسبة 11% على أنه الأسوأ، وأن نسبةً مساويةً قد صرحوا بعدم استيائهم من أيّ من العينات المقدمة لهم.



الشكل 17. نتائج تحديد المنتج الأفضل برأي المشاركين في الاختبار الحسي.

3.4.5 تقييم نية الشراء

يكشف الشكل 18 عن نيـة المشـاركين في الشراء بعد التـذوق والتقيـيم. بيّنت النتائج أن المشاركين أكثر إقبالاً على شراء الشاهد (57% سيشترونه حتماً)، ثم بدرجة أقل البسكويت المدعّم بنسبة 1% بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* حتى إن 32%، 50% منهم سيشترونه حتماً ويحتمل شراؤهم له، على الترتيب، ثم البسكويت المدعّم بالنسبة 3%. بينت النتائج أن البسكويت المدعّم بالنسبة 5% هو الأقل رواجاً بين المشاركين بقرار 10.7% فقط منهم أنهم سيشترونه حتماً (دون حتمية شراء الشاهد)، مقابل تصريح 35.7% منهم بأنهم لن يشتروه أبداً، ناهيك عن أن تخمين 17.9% منهم أنه لا يُحتمل شراؤهم له أو يُحتمل لهم ذلك أو وقفوا على الحياد. ويمكن أن يُعزى ذلك إلى إقرار معظم المشاركين في الاختبار بالاستياء من مذاقه الغريب غير المحبب في المرتبة الأولى واستهجانهم لونه الأخضر الداكن في المرتبة الثانية؛ الأمر الذي أثّر سلباً وأدى إلى اتخاذ قرار صريح وقطعي بعدم شرائهم لهذا المنتج بالمطلق، وهذا ينسجم مع ما ذُكر من أن المستهلك حول العالم يختار البسكويت بناءً على المذاق والمظهر؛ اللون والقوام (Uribe-Wandurraga وآخرون، 2021).



الشكل 18. نتائج تقييم نية الشراء للمشاركين في الاختبار الحسي.

بالمجمل، فإن جميع المعاملات قد حظيت بمشاركٍ على الأقل لديه نية حتمية بشرائها؛ مما يدلّل على قبول المستهلك لسوقٍ –وإن كان ضيقاً– يتضمن مثل هذه المنتجات التي تتميز من المألوف بإضافة وحيدة فقط، ودونما أي تحسينات حسية.

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

- تحديد التتابع الجزئي للمورثة الإشارية 18S rDNA من جينوم الطحلب ليس كافياً لتحديد هويته ولا يقدّم معلومات عن مورفولوجيا الطحلب، وبوجود مشكلات تحليل بيانات الطحالب الجزيئية لا يزال التصنيف الشكلي لجماعات الطحالب أساسياً للتغلب على ذلك، وليس مجرد خيار للاستدلال الأولي.
- يمكن أن تساعد الكتلة الحيوية للطحلب *C. vulgaris* في درء الأمراض وتحسين الصحة بما فيها من مضادات أكسدة، لذا قد يكون لمستخلصاته أثراً كبيراً في العلاجات البشرية، ويمكن تسخيرها كتركيبة دوائية.
- إن إضافة الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* بنسب تفوق 1% هي وسيلة ناجحة من أجل تدعيم محتوى البسكويت من البوتاسيوم والحديد على نحو خاص وبقية العناصر المعدنية عموماً.
- يمكن تقديم البسكويت المدعّم 1% بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس وترويجه كغذاء وظيفي لحالات فقر الدم، لأن هذا التدعيم يزيد محتوى الحديد دونما تأثير في الصفات الحسية للبسكويت كذلك، كما أن غنى الطحلب *C. vulgaris* بالفيتامين C يسهّل امتصاص الحديد من الغذاء، فهو يحوّل الحديد إلى الشكل الأسهل امتصاصاً للجسم.
- الزيادة الضئيلة في نسبة إضافة الكتلة الحيوية للطحلب يقابله زيادة كبيرة في المحتوى المعدني؛ فزيادة نسبة إضافة الكتلة الحيوية للطحلب للبسكويت من 3% إلى 5% حقق زيادة معنوية في نسبة ما يغطيه تناول g100 بسكويت من الاحتياج اليومي من الحديد والمنغنيز والنحاس والفوسفور بمقدار 300%، 34.3%، 617.9%، 64.8%، على الترتيب.
- يمكن تقديم البسكويت المدعم بنسبة 5% للمستهلك دونما إضافات أخرى، لأنه يمكن أن يلقى رواجاً عند بعض فئات المجتمع.

التوصيات

- تحسين تعريف الطحالب، من خلال عدم حصره في التوصيف الشكلي فقط، وزيادة دقة التصنيف الجزيئي بالتحليل المشترك لتتابعات أطول من المورثات الإشارية، وإرفاق التتابعات في قواعد البيانات مع شروط التنمية والخصائص الفيزيولوجية للطحلب، وعدم قبول الأصنوفة taxon المرتبطة بالتتابع في البنك الوراثي دون البحث عن معلومات أكثر من الأدبيات التصنيفية ذات الصلة.
- يمكن تقديم البسكويت المدعَّم بالكتلة الحيوية الجافة لطحلب الكلوريلا كغذاء وظيفي غني بالفيتامين B_{12} للأفراد النباتيين أو من يعاني العوز له عموماً.
- دراسة التركيب الكيميائي لوسط نمو الطحلب لتقدير المواد الكيميائية التي يطرحها الطحلب خارج الخلية.
- استخدام بعض المضافات لتحسين جاذبية البسكويت المدعَّم بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس بين شرائح المستهلكين كافة، ومحاولة التودد إلى سوق الغذاء –المتوسع يوماً بعد يوم– لقبول الطحالب الدقيقة الغذائية.
- تحسين لون البسكويت المدعَّم 5% بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب المدروس أو مذاقه ليلقى رواجاً عند شريحة أوسع من المستهلكين، أو تسويقه جنباً إلى جنب مع بسكويت ملون تجاري آخر رائج في محاولة لتخفيف شدة اللون، ليلقى رواجاً أوسع.
- إجراء اختبار حسي يتناول الأطفال؛ فهم شريحة من المستهلكين لها معاييرها في القبول والتذوق.
- تدعيم منتجات غذائية أخرى بالكتلة الحيوية الجافة للطحلب، أو تدعيم البسكويت بكتلة جافة لطحالب أخرى لتوفير منتج يجمع بين فوائد الوجبات السريعة والصحة.
- إجراء دراسات استقصائية لفهم تأثير العوامل الديموغرافية في رهاب الغذاء الجديد كمحاولة لفهم تأثير هذا الرهاب في مختلف شرائح المجتمع، ما يسمح للصناعات الغذائية بتصميم منتجات أكثر جاذبية وأكبر قابلية للشراء.
- يمكن تقديم مسحوق الكتلة الحيوية الجافة للطحلب *C. vulgaris* في كبسولات أو مضغوطات كمكمل غذائي غني بالعناصر المعدنية والبروتين ومضادات التأكسد والفيتامين B_{12} وC.

References المراجع

المراجع References

عكو، حسام؛ بإشراف: د. محمد ديب نداف ود. عدنان علي نظام. (2017). **دراسة أهم المكونات الكيميائية لبعض أنواع الطحالب المحلية من جنسي *Chlorella* و*Scenedesmus* وبعض العوامل المؤثرة في إنتاجيتها كماً ونوعاً**. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة تشرين، عدد الصفحات: 110.

Aaronson, S., Dhawale, S. W., Patni, N. J., Deangelis, B., Frank, O., & Baker, H. (1977). The Cell Content and Secretion of Water-Soluble Vitamins by Several Freshwater Algae. **Arch. microbiol.,** 112, pp. 57-29.

Abdel-Karim, O. H., Gheda, S. F., Ismail, G. A., & Abo-Shady, A. M. (2020). Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. **Delta Journal of Basic and Applied Sciences**, 41, pp. 76-86.

Abd El-Razik, M., & Mohamed, A. (2013). Utilization of acid casein curd enriched with *Chlorella vulgaris* biomass as substitute of egg in mayonnaise production. **World Applied Sciences Journal.** 26(7), pp. 917–925.

Acquah, C., Ekezie, F.-G., & Udenigwe, C. C. (2021). Potential applications of microalgae-derived proteins and peptides in the food industry. In T. Lafarga, & G. Acién, **Cultured Microalgae for the Food Industry- Current and Potential Applications** (pp. 97-126). Elsevier Inc.

Agustina, S., Aidha, N. N., & Oktarina, E. (2021). The extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* for cosmetics. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, 1011, p. 012057. doi:10.1088/1757-899X/1011/1/012057

Andrade, L. M., Andrade, C. J., Dias, M., Nascimento, C., & Mendes, M. A. (2018). *Chlorella* and *spirulina* microalgae as sources of functional foods. **Nutraceuticals, and Food Supplements,** 6(1), pp. 45-58.

AOAC. (2000). **Official Methods of Analysis of AOAC international**. 17th Ed. ed: Horwitz, W. Association of Official Analytical Chemists, Maryland, USA.

Aramouni, F., & Abu-Ghoush, M. (2011). Physicochemical and sensory characteristics of no-bake wheat–soy snack bars. **J Sci Food Agri,** 91, pp. 44–51.

Awobusuyi, T. D., Siwela, M., & Pilla, K. (2020). Sorghum–Insect Composites for Healthier Cookies: Nutritional, Functional, and Technological Evaluation. **Foods**, 9(10), p. 1427.

Badawy, T. E. M. (2005). **Physiological studies on some green algae**. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture. Cairo University. Egypt.

Balaji, M., Thamilvanan, D., Chidambara Vinayagam, S., & Balakumar, B. (2017). Anticancer, antioxidant activity and GC-MS analysis of selected micro algal members of *chlorophyceae* 13. **Int. J. Pharm. Sci. Res**., 8(8), pp. 3302–3314.

Baldwin, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae*. **Mol Phylogenet Evol**, 1, 3-16.

Bandarra, N. M., P.A. Pereira, I. Batista and M.H. Vilela. (2003). Fatty acids, sterols and tocopherol in *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Lipids**. 18:25-34.

Baracos, V., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D., & Fearon, K. (2018). Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, 4, p. 17105.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.

Batista, A., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., et al. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal Research**, 26, pp. 161–171.

Becker, E. W. (1988). Micro-algae for human and animal consumption. In M. M. Borowitzka, & L. Borowitzka, **Micro-algal biotechnology** (pp. 222-256). Cambridge University Press.

Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, 25, pp. 207– 10.

Becker, E. W. (2013). Microalgae for human and animal nutrition. In A. Richmond, & Q. Hu, **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology** (2 ed., pp. 461–503). John Wiley & Sons, Ltd.

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 yogurt and its biochemical properties. **Eur Food Res Technol**, 235, pp. 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), pp. 144-154.

Beijerinck, M. (1890). Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Ztg**. 48, p. 729.

Bellinger, E. G., & Sigee, D. C. (2015). **Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators** (2 ed.). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Bellinger, E., & Sigee, D. (2010). **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. New York: John Wiley & Sons.

Bi, Z. and B. He. (2013). Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. **Transactions of the ASABE**. 56(4), pp. 1529-1539.

Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., De Devitiis, B., *et al*. (2017). Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: a systematic review. **Appetite**, 113, pp. 141–154.

Birch, C. S., & Bonwick, G. A. (2018). Ensuring the future of functional foods. **International Journal of Food Science and Technology**, pp. 1-19.

Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). **Phycological studies. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species** (IV ed., Vol. 6318). Texas: University of Texas Publications.

Bito, T., Bito, M., Asai, Y., Takenaka, S., Yabuta, Y., Tago, K., *et al*. (2016). Characterization and quantitation of vitamin B12 compounds in various *Chlorella* supplements. **J. Agric. Food Chem.**, 64, pp. 8516–8524.

Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., & Watanabe, F. (2020). Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health. **Nutrients**, 12(2524), pp. 1-22.

Bito, T., Tanioka, Y., & Watanabe, F. (2018). Characterization of vitamin B_{12} compounds from marine foods. **Fish. Sci.,** 84, pp. 747–755.

Boesveldt, S., Bobowski, N., McCrickerd, K., Maître, I., Sulmont-Rossé, C., & Forde, C. (2018). The changing role of the senses in food choice and food intake across the lifespan. **Food Quality and Preference,** 68, pp. 80–89.

Bogue, J., & Ryan, M. (2000). **Market-Oriented New Product Development: Functional Foods and the Irish Consumer. Agribusiness Discussion Paper 27** (Vol. 27). Cork: University College, Department of Food Economics. National University of Ireland.

Bolanho, B., Egea, M., Jácome, A., Campos, I., Carvalho, J., & Danesia, E. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. **J. Food Nutr. Res.,** 53, pp. 171–179.

Bong, S., & Loh, S. (2013). A study of fatty acid composition and tocopherol content of lipid extracted from marine microalgae, *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica*, using solvent extraction and supercritical fluid extraction. **Int. J. Food Res.,** 20, pp. 721-729.

Boobier, W., Baker, J., & Davies, B. (2006). Development of a healthy biscuit: an alternative approach to biscuit manufacture. **Nutrition Journal,** 5(7), pp. 1-7.

Boutarfa, S., Senoussi, M., Gonzalez-Silvera, D., López-Jiménez, J., & Aboal, M. (2022, April 8). The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (*Scenedesmaceae*, *Chlorophyta*) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids. **Life**, 12, 560-570.

Bozarth, A., UG. Maier and S. Zauner. (2009). Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 82 (2): 195-201.

Brown, M., & Miller, K. (1992). The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture**. J. Appl. Phycol.,** 4, pp. 205–215.

Brown, M., Mular, M., Miller, I., Trenerry, C., & Farmer, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **J. Appl. Phycol.,** 11(3), pp. 247–255.

Burlew, JS. (1953). **Algal culture from laboratory to pilot plant**. Washington DC: Carnegie Institution of Washington publication. p.357.

Büyükkaragöz, A., Bas, M., Sağlam, D., & Cengiz, Ş. E. (2014). Consumers' awareness, acceptance and attitudes towards functional foods in Turkey. **International Journal of Consumer Studies**, 38(6), pp. 628-635.

Cabrita, A. R. J., M. R. G. Maia, H. M. Oliveira, I. Sousa-Pinto, A. A. Almeida, E. Pinto and A. J. M. Fonseca. (2016). Tracing seaweeds as mineral sources for farm-animals. **J. Appl. Phycol.** 28, pp. 3135–3150.

Caporgno, M., & Mathys, A. (2018). Trends in Microalgae Incorporation into Innovative Food Products with Potential Health Benefits. **Front Nutr,** 5(58), pp. 1-10.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends Food Sci. Technol**., 71, pp. 107–120. doi:10.1016/j.tifs.2017.11.008

Casales-Garcia, V., Museros, L., Sanz, I., Falomir, Z., & Gonzalez-Abril, L. (2020). Extracting feeling from food colour. In A. Abreu, J. V. Carvalho, D. Liberato, & I. S. Galdames, **Advances in Tourism, Technology and Smart Systems** (pp. 15-24). Singapore: Springer.

Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient innutrition. **Int. J. Food Sci. Nutr**., 62, pp. 794–799.

Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. **Marin Drugs**, 19(549), pp. 1-30. doi:10.3390/md19100549

Crawford, J. (2018). Cancer cachexia: Are we ready to take a step forward? **Cancer**, 124, pp. 456–458.

Croft, M., Lawrence, A., Raux-Deery, E., Warren, M., & Smith, A. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature**, 438, pp. 90–93.

Cronn, R. C., Small, R. L., Haselkorn T., & Wendel, J. F. (2002). Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: *Malvaceae*) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. **Am J Bot**, 89, 707-725.

Csiro, L. D. (2011). Wheat gluten: production, properties and application. In G. O. Phillips, & P. A. Williams, **Handbook of food proteins** (Vol. 22, pp. 267-288). Woodhead Publishing Limited.

Dagnelie, P., van Staveren, W., & van den Berg, H. (1991). Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. **Am. J. Clin. Nutr,** 53, pp. 695–697.

Dahiya, A. (2014). **Bioenergy: Biomass to Biofuel** (1st ed. ed.). Boston: Academic Press.

Dapra, L. (2016). **Genotyping, Cryopreservation and Bioactive Compounds of Aero-terrestrial Algae**. Innsbruck: Universität Innsbruck.

Das, A., U. Raychaudhuri and R. Chakraborty. (2012). Cereal based functional food of Indian subcontinent: a review. **Journal of food science and technology**. 49(6): 665–672.

De Roeck-Holtzhauer Y., I. Quere and C. Claire. (1991). Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. **Journal of Applied Phycology**. 3, pp. 259-264.

Del Mondo, A., Smerilli, A., Sané, E., Sansone, C., & Brunet, C. (2020). Challenging microalgal vitamins for human Health. **BMC**, 19(201), pp. 1-23.

Dillard, G. E. (1989). Freshwater algae of the southeastern United States, part 1 *Chlorophyceae*: *Volvocales*, *Tetrasporales* and *Chlorococcales*. **Bibl. Phycol**. 81, p. 801.

Dillard, G. E. (2007). Freshwater algae of the southeastern United States, part 8. *Chrysophyceae*, *Xanthophyceae*, *Cryptophyceae* and *Dinophyceae*. **Bibl. Phycol.,** 112, p. 127.

Donato, M., M.H. Vilela, and N. M. Bandarra. (2003). Fatty acids, sterols, α-tocopherol and total carotenoids composition of *Diacronema vlkianum*. **Journal of Food Lipids**, 10, pp: 267-276.

Dubouzet, J. G., & Shinoda, K. (1999). Relationships among old and new world Alliums according to ITS DNA sequence analysis. **Theor. Appl. Genet** 98: 422-433.

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**, 82, p. 103226.

El-fayoumy, E. A., Shanab, S. M., Gaballa, H. S., Tantawy, M. A., & Shalaby, E. A. (2021). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and different fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 21(51), pp. 1-16. doi:10.1186/s12906-020-03194-x

Engel, R., L. Abrankó, É. Stefanovits-Bányai and P. Fodor. (2010). Simultaneous determination of water soluble vitamins in fortified food products. **Acta Alimentaria** 39 (1): 48-58.

Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijtsma, L. (2014). **Microalgae-Based Products for the Food and Feed Sector: An Outlook for Europe**. (M. Vigani, C. Parisi, & E. R. Cerezo, Eds.) Luxembourg, European Union: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Prospective Technological Studies.

FAO, WHO. World Health Organization. (2004). **Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition**. 2ed edition. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/2004. Retrieved from May 2019.

Faridi, H., Gaines, C., & Finney, P. (1994). Soft wheat quality in production of cookies and crackers. In W. Bushuk, & V. Rasper, **Wheat** (pp. 154-168). Boston, MA, USA: Springer.

Favas, R., Morone, J., Martins, R., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2021). Cyanobacteria and microalgae bioactive compounds in skin-ageing: potential to restore extracellular matrix filling and overcome hyperpigmentation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 36(1), pp. 1829–1838.

Fawley, M. W., & Fawley, K. P. (2021). Identification of Eukaryotic Microalgal Strains. **Journal of applied phycology**, 32(5), pp. 2699–2709.

FDA, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. U. S. 2019. **Publication Code: DGDL54**. https://epublication.fda.gov/epub/ePubHome.xhtml?faces-redirect=true#, Retrieved from May 2019.

Fernandes, B., Dragone, G., Abreu, A., Geada, P., Teixeira, J., & Vicente, A. (2012). Starch determination in *Chlorella vulgaris* – a comparison between acid and enzymatic methods. **J Appl Phycol.,** 24, pp. 1203–1208.

Forest, H. S. (1954). **Handbook of Algae**. Knoxville: University of Tennessee Press.

Fradique, M., Batista, A., Nunes, M., Gouveia, L., Bandarra, N., & Raymundo, A. (2010). incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products, Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90(10), pp. 1656–1664.

Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D. M., et al. (2019). Microalgal Derivatives as Potential Nutraceutical and Food Supplements for Human Health: A Focus on Cancer Prevention and Interception. **Nutrients**, 11(6), pp. 1226.

Garcia, J., de Vicente, M., & Galan, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microb Biotechnol**., 10, pp. 1017–24.

Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. **Algal Research**, 52, p. 102104. doi:10.1016/j.algal.2020.102104

Geitler, L. (1931). ***Cyanophyceae***. Germany: Koeltz Scientific Books for Edition Karin Koeltz.

Gelgor, R. D., Ozcelik, D., & Haznedaroglu, B. Z. (2022). Effects of baking on the biochemical composition of *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, 65(102716).

Gennaro, M. C., & Bertolo, P. L. (1990). L-Ascorbic Acid Determination in Fruits and Medical Formulations by Ion Interaction Reagent Reverse Phase HPLC Technique. **Journal of Liquid Chromatography**, 13(7), pp. 1419-1434.

Goecke, F., Noda, J., Paliocha, M., & Gislerød, H. (2020). Revision of *Coelastrella* (*Scenedesmaceae, Chlorophyta*) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. **World J. Microbiol. Biotechnol**., 36, 149.

Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. **Algal Research**, 7, pp. 51-57.

González, L., Cañizares, R., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresour Technol**, 60, pp. 259–262.

Görs, M., Schumann, R., Hepperle, D., & Karsten, U. (2009). Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. **J Appl Phycol,** pp. 1-12.

Gouveia, L., Batista, A., Miranda, A., Empis, J., & Raymundo, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as coloring source in traditional butter cookies. **Innovative Food Sci Emerg Technol**., 8, pp. 433–6.

Gouveia, L., Batista, A., Sousa, I., Raymundo, A., & Bandarra, N. (2008). Microalgae in Novel Food Products. In K. Papadopoulos (Ed.), **Food Chemistry Research Developments** (pp. 75-112). Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers.

Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., & Raymundo, A. (2018). Impact of *Chlorella vulgaris* on the rheology of wheat flour dough and bread texture. **LWT Food Science and Technology**, 89, pp. 466–474.

Graham, W. D., & Annette, D. (1992). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in potatoes (*Solanum tuberosum*) and strawberries using ion-exclusion chromatography. **Chromatogr**, 594, pp. 187-194.

Grobbelaar, J. (2003). Quality control and assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. **J Appl Phycol**, 15, pp. 209–215.

Guedes, É., Silva, T., Aguiar, J., Barros, L., Pinotti, L., & Sant'Ana, A. (2013). Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 23, pp. 668-673.

Guil-Guerrero, J., Navarro-Juárez, R., López-Mart nez, J., Campra-Madrid, P., Rebolloso-Fuentes, M., (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. **J Food Eng**, (65), pp. 511-517.

Guiry, M. D. (2012). How Many Species of Algae Are There? **Journal of phycology**, 48(5), pp. 1057–1063.

Guiry, M. D. (2021). AlgaeBase: A Global Database for Algae. **Current Science**, 121(1), pp. 10-11.

Guiry, M., & Guiry, G. (2014). ***Coelastrella Chodat*, 1922**. (M. Guiry, Editor, & National University of Ireland, Galway) Retrieved 4 27, 2022, from AlgaeBase: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=45299

Guiry, M., & Guiry, G. (2019). ***Asterarcys Comas Gonzáles*, 1981**. (M. Guiry, Editor, & National University of Ireland, Galway.) Retrieved 4 27, 2022, from algaebase: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=45139

Guiry, M., Guiry, M., & Guiry, G. (2022). ***Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890**. (National University of Ireland, Galway) Retrieved April 12, 2022, from algaebase: https://www.algaebase.org

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2022). **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org; searched on August 21, 2022. June 06, 2022 05:00 AM Eastern Daylight Time.

Gulati, O., & Berry, O. (2006). Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. **Toxicology**, 221, pp. 75–87.

Gupta, R. K., S. S. Gangoliya and N. K. Singh. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **J. Food Sci. Technol.** 52(2):676–684.

Habashya, N. H., Abu Serie, M. M., Attia, W. E., & Abdelgaleil, S. A. (2018). Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. **Journal of Functional Foods**, 40, pp. 317–328. doi:10.1016/j.jff.2017.11.022

Hailu, G., Boecker, A., Henson, S., & Cranfield, J. (2009). Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. **Appetite**, 52(2), pp. 257-265.

Hall, J. D., Fucikova, K., LO, C., Lewis, L. A., & Karol, K. G. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie Algologie**, 31(4), pp. 529–555.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, pp. 95-98.

Hazley, D., Stack, M., Walton, J., McNulty, B. A., & Kearney, J. M. (2022, January 20). Food neophobia across the life course: Pooling data from five national cross-sectional surveys in Ireland. **Appetite**, 171(105941), pp. 1-10.

Heimann, K., Huerlimann, R., (2015). Chapter 3 - Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. In: Kim, S.-K. (Ed.), **Handbook of Marine Microalgae**. Academic Press, Boston, 978-0-12-800776-1, pp. 25–41. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00003-0.

Hershkovitz, M. A., & Lewis, L. A. (1996). Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Mol Biol Evol,** 13, 1276-1295.

Hershkovitz, M. A., Zimmer, E. A., & Hahn, W. J. (1999). Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman and R.J. Gornall eds. **Molecular systematics and plant evolution**. Taylor & Francis, London pp. 268-326.

Hess, J. M., & Slavin, J. L. (2017). Healthy snacks: using nutrient profiling to evaluate the nutrient-density of common snacks in the United States. **Journal of Food Science**, 82(9), pp. 2213–2220.

Heuvel, E. v., Newbury, A., & Appleton, K. M. (2019). The Psychology of Nutrition with Advancing Age: Focus on Food Neophobia. **Nutrients**, 11(151), pp. 1-13.

HHS, Services, U. D., USDA, & Agriculture, U. D. (2015). **2015–2020 Dietary Guidelines for Americans** (8th ed.). U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture.

Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, 66(4), pp. 411-453.

Hoseney, R., Wade, P., & Finley, J. (1988). Soft wheat products. In Y. Pomeranz, **Wheat Chemistry and Technology** (3 ed., Vol. II, pp. 407–456). USA: American Association of Cereal Chemists Monograph Series.

Hossain, A., Brennan, M., Mason, S., Guo, X., Zeng, X., & Brennan, C. (2017). The effect of astaxanthin-rich microalgae "*Haematococcus pluvialis*" and wholemeal flours incorporation in improving the physical and functional properties of cookies. **Foods**, 6(8), p. 57.

Hsiao, C., Chatterton, N. J., Asay, K. H., & Jensen, K. B. (1994). Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. **Genome**, 37(1), pp.112-120.

Huss, V., & Sogin, M. (1990). Phylogenetic Position of Some *Chlorella* Species within the *Chlorococcales* Based upon Complete Small-Subunit Ribosomal RNA Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 31, pp. 432-442.

Huss, V., Frank, C., Hartmann, E., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B., *et al.* (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (*Chlorophyta*). **Phycologia**, 35(3), pp. 587–598.

Hwang, U.-W., & Kim, W. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. **The Korean Journal of Parasitology**, 37(4), pp. 215-228.

Igual, M., Uribe-Wandurraga, Z. N., García-Segovia, P., & Martínez-Monzo, J. (2021). Microalgae-enriched breadsticks: Analysis for vitamin C, carotenoids, and chlorophyll a. **Food Science and Technology International**, 0(0), pp. 1-6.

Islam, M., Alsenani, F., & Schenk, P. (2018). Microalgae as a Sustainable Source of Nutraceuticals. In V. K. Gupta, H. Treichel, V. Shapaval, L. Antonio de Oliveira, M. G. Tuohy, **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals** (1 ed., pp. 1-19). John Wiley & Sons Ltd.

ISO, EN ISO 8589. (2010). **Sensory Analysis; General Guidance for the Design of Test Rooms.**

Jaeger, S., Rasmussen, M., & Prescott, J. (2017). Relationships between food neophobia and food intake and preferences: Findings from a sample of New Zealand adults. **Appetite**, 116, pp. 410–422.

Jalilian, N., Najafpour, G., & Khajouei, M. (2019). Enhanced vitamin B12 production using *chlorella vulgaris*. **International Journal of Engineering (IJE), IJE Transactions A: Basics**, 32(1), pp. 1-9.

Jäpelt, R., & Jakobsen, J. (2013). Vitamin D in plants: A review of occurrence, analysis, and biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**. 4, p. 136.

Jeon, J., Kwon, J., Kang, S. et al. (2014). Optimisation of culture media for large-scale lutein production by heterotrophic *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology Progress**, 30, pp. 736–743.

John, D. M., Whitton, B. A., & Brook, A. J. (2011). **The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae** (2 ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Jorge, E. M., H. P. Wolfgang and B. Peter. (2008). Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current opinion in plant biology.** 11, pp. 166–170.

Jung, H., Ok, H., Park, M., Kim, J. & Kwon, O. (2016). Bioavailability of carotenoids from *chlorella* powder in healthy subjects: a comparison with marigold petal extract. **Journal of Functional Foods**, 21, 27–35.

Kahlert, M., Albert, R.-L., Anttila, E. L., Bengtsson, R., Bigler, C., Eskola, T., *et al.* (2008). Harmonization is more important than experience - results of the first Nordic–Baltic diatom intercalibration exercise 2007 (stream monitoring). **J. Appl. Phycol.**, 20, pp. 227-235.

Kai Ru, I. T., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Abdul Wahid, M. E., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. **Applied Phycology**, 1(1), pp. 2-11.

Kay, R. A. and L. L. Barton. (1991). Microalgae as food and supplement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 30(6), pp. 555-573.

Kent, M., Welladsen, H., Mangott, A., & Li, Y. (2015). Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. (S. Kumar, Ed.) **PLoS ONE**, 10(2), p. e0118985.

Kent, T., Lapik, Y. R., & Pestov, D. G. (2009). The 5′ external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. **RNA**, 15(1), pp. 14-20.

Kessler, E. (1976). Comparative physiology, biochemistry, and the taxonomy of *Chlorella* (*Chlorophyceae*). **Plant Syst. Evol.,** 125, pp. 129-138.

Kessler, E., & Huss, V. (1992). Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (*Chlorophyceae*) strains of the Culture Collection of the University Texas at Austin. **J Phycol**, 28(4), pp. 550–553.

Klamczynska, B., & Mooney, W. (2017). Heterotrophic Microalgae: A Scalable and Sustainable Protein Source. In S. R. Nadathur, J. P. Wanasundara, & L. Scanlin, **Sustainable Protein Sources** (pp. 327-339). London, UK: Elsevier Inc.

Kollár, J., Pinseel, E., Vanormelingen, P., Poulíčková, A., Souffreau, C., Dvořák, P., *et al*. (2019). A polyphasic approach to the delimitation of diatom species: a case study for the genus *Pinnularia* (*Bacillariophyta*). **J Phycol**, 55, pp. 365–379.

Komárek, J., & Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4–Nostocales. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie**, Supplement Volumes, 56, pp. 247–345.

Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., & Show, P.-L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, 8, pp. 16-24.

Kraemer, K., Semba, R. D., Eggersdorfer, M., Schaumberg, D. A. (2012). Introduction: The Diverse and Essential Biological Functions of Vitamins. **Ann Nutr Metab**, 61, pp. 185–191.

Krienitz, L., & Bock, C. (2012). Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, 698(1), pp. 295-326.

Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D., Huss, V., Rohr, T., & Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). **Phycologia**, 43 (5), pp. 529–542.

Krystallis, A., Maglaras, G., & Mamalis, S. (2008). Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods 525e538. **Food Quality and Preference**, 19(6), pp. 525-538.

Kumudha, A., Selvakumar, S., Dilshad, P., Vaidyanathan, G., Thakur, M. S., & Sarada, R. (2015). Methylcobalamin – A form of vitamin B_{12} identified and characterised in *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, 170, pp. 316-320.

Kyong, H., Jang, M.-H., Joo, G.-J., & Takamura, N. (2001). Growth and Morphological Changes in *Scenedesmus dimorphus* Induced by Substances Released from Grazers, *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Korean J. Limnol**, 34(4), p. 285~291.

Lafarga, T., Acién-Fernández, F. G., Castellari, M., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **LWT- Food Science and Technology**, 111, pp. 167-174.

Lakshmana Senthil, S., Suja, C., Anantharaman, P., Kannan, K., & Kathiresan, S. (2019). First record of *Coelastrella vacuolata* (*Chlorophyta*: *Scenedesmaceae*) in Tuticorin coast, Gulf of Mannar. **Indian Journal of Geo Marine Sciences**, 48(12), pp. 1860-1863.

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. M., Valentin, F., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, pp. 2947-2948.

Lavoie, I., Lento, J., & Morin, A. (2010). Inadequacy of size distributions of stream benthic diatoms for environmental monitoring**. J. N. Benthol**. Soc., 29, pp. 586–601.

Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J. M., Zuccarello, G. C., *et al*. (2014). DNA-based species delimitation in algae. **Eur J Phycol**, 49(2), 179–196.

Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnol. Adv.,** p. 107545.

Li, J., Davis, C. C., Donoghue, M. J., Kelley, S., & Tredici, P. D. (2001). Phylogenetic relationships of Torreya (*Taxaceae*) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region. **Harvard Pap Bot**, 6, 275-281.

Likert, R. (1932). A technique for the measurement of attitudes. **Archives of psychology**, 140(22), pp. 5-55.

Lim, D., & Schenk, P. (2017). Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain engineering**. AIMS Bioeng**, 40(1), pp. 151–161.

Ling, A., Yasir, S., Matanjun, P., & Abu Bakar, M. (2015). Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. **J Appl Phycol**, 27, pp. 1717–1723.

Liu, K. (2017). Characterization of ash in algae and other materials by determination of wet acid indigestible ash and microscopic examination. **Algal Research**, 25, pp. 307-321.

Liu, X. y., & Hong, Y. (2021). Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: A Brief Review. **Current Pollution Reports**, 7, pp. 227–245.

Lloyd, C., Tan, K. H., Lim, K. L., Valu, V. G., Fun, S. M., Chye, T. R., et al. (2021). Identification of microalgae cultured in Bold's Basal medium from freshwater samples, from a high-rise city. **Scientific Reports**. 11, 4474. https://doi.org/10.1038/s41598-021-84112-0

López-Bautista, J., Rindi, F., & Guiry, M. D. (2006). Molecular systematics of the subaerial green algal order *Trentepohliales*: An assessment based on morphological and molecular data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56(7), pp. 1709–1715.

López-García, P., Rodríguez-Valera, F., P.-A. C., & Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. **Nature**, 409, pp. 603-607.

Lourenço, S., Moldão-Martins, M., & Alves, V. (2019). Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. **Molecules**, 24(22), p. 4132. doi:10.3390/molecules24224132

Lucakova, S., Branyikova, I., & Hayes, M. (2022). Microalgal Proteins and Bioactives for Food, Feed, and Other Applications. **Appl. Sci**., 12(4402), pp. 1-25.

Lücking, R. (2008). Taxonomy: a discipline on the brink of extinction- are DNA barcode scanners the future of biodiversity research? **Arch. Sci.,** 61, pp. 75–88.

Luiten, E.E., I. Akkerman, A. Koulman, P. Kamermans, H. Reith, M.J. Barbosa, D. Sipkema and R.H. Wijffels. (2003). Realizing the promises of marine biotechnology. **Biomol Eng**. 20, pp. 429-439.

Machu, L. M., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. **Molecules**, 20(1), pp. 1118 –1133.

Malcata, F.X., Pinto, I.S., Guedes, A.C., Pinto, I.S., Guedes, A.C. (2019). **Marine Macro- and Microalgae: An Overview**. CRC Press. P.342.

Maltsev, Y., Krivova, Z., Maltseva, S., Maltseva, K., Gorshkova, E., Kulikovskiy, M. (2021). Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (*Scenedesmaceae*, *Sphaeropleales*) during nitrogen and phosphorus starvation. **Sci. Rep.,** 11, 19818.

Manoylov, K. M. (2014). Taxonomic identifications of algae (morphological and molecular), species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment**. Journal of Phycology**, 50(3), pp. 409-424.

Marino, T., Iovine, A., Casella, P., Martino, M., Chianese, S., Larocca, V., et al. (2020). From *Haematococcus pluvialis* microalgae a powerful antioxidant for cosmetic applications. **Chem. Eng. Trans**., 79, pp. 271-276.

Martínez–Hernández, G., Castillejo, N., Carrión–Monteagudo, M. d., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2018). Nutritional and bioactive compounds of commercialized algae powders used as food supplements. **Food Science and Technology International**, 24(2), pp. 172–182.

Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y., & Hirayama, K. (1997). Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer Brachionus. **Hydrobiologia**, 358, pp. 133–138.

Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. **Food & Function**, 8(8), pp. 2672–2685.

Mehariya, S., Goswami, R., Karthikeysan, O., & Verma, P. (2021). Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. **Chemosphere**, 280 (130553), pp. 1-23.

Meiklejohn, K., Damaso, N., Robertson, J. M. (2019). Assessment of BOLD and GenBank - Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. **PLoS One**, 14, p. e0217084.

Meiselman, H., King, S., & Gillette, M. (2010). The demographics of neophobia in a large commercial US sample. **Food Quality and Preference**, 21, pp. 893-897.

Melkonian, M. (1990). Phylum *Chlorophyta*. Introduction to the *Chlorophyta*. In L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, & D. J. Chapman, **Handbook of Protoctista** (pp. 597–599). Boston: Jones & Bartlett.

Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering,** 56(2-3), pp. 181–188.

Mills, S., Wilcox, C., Ibrahim, K., & Roberts, H. (2018). Can fortified foods and snacks increase the energy and protein intake of hospitalised older patients? A systematic review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, 31, pp. 379–389.

Mishra, B. K., A. Rastogi and S. Shukla. (2012). Regulatory Role of Mineral Elements in the Metabolism of Medicinal Plants. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**. 6(1), pp. 1 – 23.

Misurcova, L., S. Skrovankova, D. Samek, J. Ambrozova and L. Machu. (2012). Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. **Advances in Food and Nutrition Research**. 66: 75-145.

Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some promising microalgal species for commercial applications: A review. **Energy Procedia**, 110, pp. 510 – 517.

Mohamed, A., Abo-El-Khair, B., & Shalaby, S. M. (2013). Quality of Novel Healthy Processed Cheese Analogue Enhanced with Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* Biomass. **World Applied Sciences Journal**, 23(7), pp. 914-925.

Mohamed, A.G., B.E. Abo-El-Khair and S. M. Shalaby. (2013). Quality of Novel Healthy Processed Cheese Analogue Enhanced with Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* Biomass. **World Applied Sciences Journal**. 23(7): 914-925.

Mokronsnop, V., & Zolotareva, E. (2014). Microalgae as tocopherol producers. **Biotechnol. Acta**, 7, pp. 26–33.

Molina-Grima, E., Belarbi, E.-H., Acién Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalga biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, 20(7-8), pp. 491 – 515.

Moore, A. (2001). Blooming prospects? Humans have eaten seaweed for millennia; now microalgae are to be served up in a variety of novel health supplements, medicaments and preparations. **EMBO Rep**., 2, pp. 462–464.

Moorman, C., & Matulich, E. (1993). A model of consumers' preventive health behaviors: The role of health motivation and health ability. **Journal of Consumer Research**, 20(2), pp. 208-228.

Mota, CSC, Pinto O, Sá T, Ferreira M, Delerue-Matos C, Cabrita ARJ, Almeida A, Abreu H, Silva J, Fonseca AJM, Valente LMP and Maia MRG. (2023). A commercial blend of macroalgae and microalgae promotes digestibility, growth performance, and muscle nutritional value of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. **Frontiers in Nutrition**. 10, 1165343.

Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. (2020). Assessment of Antioxidant Contents and Free Radical-Scavenging Capacity of *Chlorella vulgaris* Cultivated in Low Cost Media. **Applied Sciences**, 10(8611), pp. 1-11. doi:10.3390/app10238611

Muhammad, R., Abdullah, K. M., Mohd Zahari, M. S., & Md. Sharif, M. S. (2015). Revealing the Scenario of Food Neophobia among Higher Learning Institution Students from Klang Valley, Malaysia. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, 170, pp. 292-299.

Natrah, F., F. Yusoff, M. Shariff, F. Abas and N. Mariana. (2007). Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **J Appl Phycol**, 19: 711-718.

Neenan, B., Feinberg, D., Hill, A., Mcintosh, R., & Terry, K. (1986). Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. Solar Energy Research Institute. **Solar Energy Research Institute Report**.

Norhayati, M., Mohd Fairulnizal, M., Zaiton, A., Wan Syuriahti, W., Rusidah, S., Aswir, A., et al. (2015). Nutritional Composition of Selected Commercial Biscuits in Malaysia. **Sains Malaysiana**, 44(4), pp. 581–591.

Norton, TA., M. Melkoniam and RA. Anderson. (1996). Algal biodiversity. **Phycologia**. 35:308–326.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(8), pp. 3327–3332.

Okkou, Hussaam; Ali Nizam, Adnan; Naddaf, Mohammad; Azmeh, Mohammad Fawaz. (2018). Influence of Fermentation Temperature and Sodium Nitrate Concentration on Growth Rate and Biomass Production of Local Chlorella Vulgaris Using Stirred Tank Photobioreactor. **The Arab Journal for Arid Environments**, 11(1-2), pp. 35-43.

Okumus, B., Dedeoğlu, B. B., & Shi, F. (2021). Gender and generation as antecedents of food neophobia and food neophilia. Tourism **Management Perspectives**, 37, p. 100773.

Oshodi, A. A., Ipinmoroti, K. O., & Adeyeye, E. I. (1997). Functional properties of some varieties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) flour — III,. International **Journal of Food Sciences and Nutrition**, 48(4), pp. 243-250.

OWH. (2022). **World Health Statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals** (Vols. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO). Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.: World Health Organization.

Panahi, Y., Pishgoo, B., Jalalian, H. R., Mohammadi, E., Taghipour, H. R., Sahebkar, A., et al. (2012). Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* as an adjunctive therapy for dyslipidemia: Results of a randomised open-label clinical trial. **Nutrition & Dietetics**, 69, pp. 13-19.

Panahi, Y., R. Badeli, G. R. Karami, Z. Badeli and A. Sahebkar. (2015). A randomized controlled trial of 6-week *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with major depressive disorder. **Complement Ther Med**. 23(4):598–602.

Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S., & Hebert, P. (2020). BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? **PLoS One**, 15(4), p. e0231814.

Perkovi´c, L., Djedovi´c, E., Vujovi´c, T., Bakovi´c, M., Paradžik, T., & C˘ ož-Rakovac, R. (2022). Biotechnological Enhancement of Probiotics through Co-Cultivation with Algae: Future or a Trend? **Marine Drugs**, 20, p. 142.

Pfandl, K., Chatzinotas, A., Dyal, P., & Boenigk, J. (2009). SSU rRNA gene variation resolves population heterogeneity and ecophysiological differentiation within a morphospecies (*Stramenopiles, Chrysophyceae*). **Limnology and Oceanography**, 54(1), pp. 171–181.

Piorreck, M., K. H. Baasch and P. Pohl. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**. 23(2): 207 - 216.

Plank, D. W., Szpylka, J., Sapirstein, H., Woollard, D., Zapf, C. M., Lee, V., . . . Stringer, M. (2012). Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2, 2′-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04. **Journal of AOAC International**, 95(6), pp. 1562-1569. doi:10.5740/jaoacint.CS2012_04

Pratt, R., & Johnson, E. (1967). Vitamin C and Choline Content of *Chlorella vulgaris* and *C. pyrenoidosa*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 56(4), pp. 536-537.

Predieri, S., Sinesio, F., Monteleone, E., Spinelli, S., Cianciabella, M., Daniele, G. M., et al. (2020, June 15). Gender, Age, Geographical Area, Food Neophobia and Their Relationships with the Adherence to the Mediterranean Diet: New Insights from a Large Population Cross-Sectional Study. **Nutrients**, 12(6), p. 1778.

Prescott, G. W. (1931). **Iowa Algae**. Iowa City: University of Iowa.

Prescott, G. W. (1962). **The Algae of the Western Great Lakes Area**. Iowa: Wm. C. Brown Co., Dubuque.

Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Algal Biomass Utln**., 3(4), pp. 89–100.

Pröschold, T., & Leliaert, F. (2007). Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In J. Brodie & J. M. Lewis (Eds.), **Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics**. Boca Raton, FL. USA. CRC Press. pp. 123–153.

Puhakka, R., Valve, R., & Sinkkonen, A. (2017). Older consumers'perceptions of functional foods and non-edible health-enhancing innovations. International **Journal of Consumer Studies**, 42(1), pp. 111–119.

Pulz, O. & W. Gross. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 65, pp. 635–648

Rabadán, A., & Bernabéu, R. (2021). A systematic review of studies using the Food Neophobia Scale: Conclusions from thirty years of studies. **Food Quality and Preference**, 93, p. 104241.

Raja, R. Hemaiswarya, S., Ravikumar, Ramanujam and Carvalho, Isabel (2019). Microalgae biomass production. In X. Malcata, I. S. Pinto, & A. C. Guedes. **Marine Macro- and Microalgae: An Overview**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. pp. 63-77.

Raja, R., Coelho, A., Hemaiswarya, S., Kumarc, P., Carvalhoa, I. S., & Alagarsamy, A. (2018). Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool. **Journal of Basic and Applied Sciences**, 7, pp. 740–747.

Ramos-Romero, S., Torrella, J., Pagès, T., Viscor, G., & Torres, J. (2021). Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. **Nutrients**, 13(563), pp. 1-16.

Rani, K., Sandal, N., & Sahoo, P. (2018). A comprehensive review on *chlorella*-its composition, health benefits, market and regulatory scenario. **Pharma Innov. J.,** 7, pp. 584–589.

Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., Morowvat, M. H., & Mohagheghzadeh, A. (2009). PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. **Food Chemistry**, 116(1), pp. 129-136.

Rawat, N., & Darappa, I. (2015). Effect of ingredients on rheological, nutritional and quality characteristics of fibre and protein enriched baked energy bars. **J Food Sci Technol**, 52(5), pp. 3006–3013.

Rizzolo, A., & Polesello, S. (1992). Chromatographic determination of vitamins in foods. **Journal of Chromatography**, 624, pp. 103-I 52.

Roberfroid, M. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. British **Journal of Nutrition**, 88(2), pp. 133-138.

Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W. H., et al. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. **Current Biology,** 15(14), pp. 1325–1330.

Rodriguez-Garcia, I. and JL. Guil-Guerrero. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chem.** 108(3), pp.1023–1026.

Rodríguez-Salinas, E., Remacley, C., & Gonzalez-Halphen, D. (2012). Chapter Eight -Green Algae Genomics: A Mitochondrial Perspective. **Advances in Botanical Research**, 63, pp. 188-214.

Ruggiero, M., Gordon, D., Orrell, T., Bailly, N., B. T., Brusca, R., et al. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. (E. V. Thuesen, Ed.) **PLoS One**, 100(4), p. e0119248.

Sääksjärvi, M., Holmlund, M., & Tanskane, N. (2009). Consumer knowledge of functional foods. **The International Review of Retail, Distribution and Consumer**, 19(2), pp. 135-156.

Sansone, C., & Brunet, C. (2019). Promises and challenges of microalgal antioxidant production. **Antioxidants**, 8(7), pp. 1-9.

Savvidou, M., Georgiopoulou, I., Antoniou, N., Tzima, S., Kontou, M., Louli, V., . . . Kolisis, F. (2023). Extracts from *Chlorella vulgaris* Protect Mesenchymal Stromal Cells from Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide. **Plants**, 12, p. 361. doi:10.3390/plants12020361.

Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **J. Appl. Phycol**, 25, pp. 523–529.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: Areview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 35, pp. 265–278.

Salvia, S., Mirzah, M., Yetti, M., & Endang, P. (2014). The Optimizing of Growth and Quality of *Chlorella vulgaris* as ASUH feed supplement for Broiler. **International Journal on Advanced Science Engineering and Information Technology**, 4(4), pp. 90-93.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. New York, USA: Cold Spring: Harbor Laboratory Press.

Samek, D., Mišurcová, L., Machů, L., Buňka, F., & Fišera, M. (2013). Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. **Turkish Journal of Biochemistry**, 38(4), pp. 360–368.

Santiago-Morales, I., Trujillo-Valle, L., Márquez-Rocha, F., & López Hernández, J. (2018). Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae as Potential Food Antioxidants. **Appl. Food Biotechnol**, 5, pp. 19–27.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd Allah, E. (2017). Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. **Saudi J. Biol. Sci.,** 26(4), pp. 709-722.

Scaglioni, P. T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V. B., Abreu, P. C., Badiale-Furlong, E. (2018,) Inhibition of Enzymatic and Oxidative Processes by Phenolic Extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. **Food Technology & Biotechnology**, 56(3), pp. 344-353. doi:10.17113/ftb.56.03.18.5495.

Schneider, S. C., Lawniczak, A. E., Picińska-Faltynowicz, J., & Szoszkiewicz, K. (2011). Do macrophytes, diatoms and non-diatom benthic algae give redundant information? Results from a case study in Poland. **Limnologica**, 42, pp. 204–11.

Sergi, G., Bano, G., Pizzato, S., Veronese, N., & Manzato, E. (2017). Taste loss in the elderly: possible implications for dietary habits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, pp. 3684–3689.

Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Amini Khoeyi, Z. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **J Appl Phycol**, 23, pp. 721–726.

Seyidoglu, N., Inan, S., & Aydin, C. (2017). A prominent superfood: *Spirulina platensis*. In N. Shiomi, & V. Waisundara (Eds.), **Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine** (pp. 1-27). London: Intech Open.

Shay, E.G. (1993). Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass Bioenerg**. 4, pp. 227-242.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy‘s Aquatic Species Program. the U.S. Department of Energy‘s Aquatic Species Program. **National Renewable Energy Laboratory**.

Sikiru, A., Arangasamy, A., Alemede, I., Guvvala, P., Egena, S., Ippala, J., & Bhatta, R. (2019). *Chlorella vulgaris* supplementation effects on performances, oxidative stress and antioxidant genes expression in liver and ovaries of New Zealand White rabbits. **Heliyon**, 5(9), p. e02470 . doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02470.

Singh, D., Khattar, J., Rajput, A., Chaudhary, R., & Singh, R. (2019). High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. (M.-J. Virolle, Ed.) **PLoS ONE**, 14(9), p. e0221930.

Slapeta, J., Moreira, D., & Lopez-Garcia, P. (2005). The extent of protest diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. **Proc.Biol. Sci.,** 272(1576), pp. 2073–2081.

Sluys, R. (2013). The unappreciated, fundamentally analytical nature of taxonomy and the implications for the inventory of biodiversity**. Biodivers. Conserv**, 22, pp. 1095–105.

Smerilli, A., Balzano, S., Maselli, M., Blasio, M., Orefice, I., Galasso, C., et al. (2019). Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom *skeletonema marinoi*. **Antioxidants**, 8(6), p. 154.

Smerilli, A., Orefice, I., Corato, F., Olea, A. G., Ruban, A., & Brunet, C. (2017). Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *skeletonema marinoi*. **Environ. Microbiol**., 19(2), pp. 611–627.

Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Mark Welch, D., Huse, S., & Neal, P. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103(32), pp. 12115-12120.

Soltani, N. L., Alnajar, N., Dezfulian, M., Shokarvi, S., Heydari, M., Choopani, A. (2016). Biochemical and Physiological Characterization of Tree Microalgae spp. as Candidates for Food Supplement. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, 3(1), pp. 377-381.

Soucier, V. D., Doma, K. M., Farrell, E. L., Leith-Bailey, E. R., & Duncan, A. M. (2019). An examination of food neophobia in older adults. **Food Quality & Preference**, 72, pp. 143–146.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae**. J Biosci Bioeng**., 101, pp. 87–96.

Stancheva, R., Hall, J. D., McCourt, R. M., & Sheath, R. J. (2013). Identity and phylogenetic placement of *Spirogyra* species (*Zygnematophyceae*, *Charophyta*) from California streams and elsewhere. **J. Phycol**., 49, pp. 588–607.

Stevenson, J. R. (2006). Refining diatom indicators for valued ecological attributes and development of water quality criteria. In N. Ognjanova-Rumenova, & K. Manoylov, **Advances in Phycological Studies** (pp. 365–83). Moscow: Pensoft Publishers.

Stevenson, R. J., Pan, Y., Manoylov, K. M., Parker, C. A., Larsen, D. P., & Herlihy, A. T. (2008). Development of diatom indicators of ecological conditions for streams of the western US. **J. N. Benthol. Soc**., 27, pp. 1000–16.

Stratton, L., Vella, M., Sheeshka, J., & Duncan, A. (2015). Food neophobia is related to factors associated with functional food consumption in older adults. **Food Qual. Prefer**., 41, pp. 133–140.

Strejckova, A., Dvorak, M., Klejdus, B., Krystofova, O., Hedbavny, J., Adam, V., et al. (2019). The strong reaction of simple phenolic acids during oxidative stress caused by nickel, cadmium and copper in the microalga *Scenedesmus quadricauda*. **New biotechnology**, 48, pp. 66-75.

Syed, S., Arasu, A., & Ponnuswamy, I. (2015). The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: The Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. **International Journal of BioScience and BioTechnology,** 7(1), pp. 185-190.

Szabo, N., Matulks, R., & Chan, T. (2013). Safety evaluation of Whole Algalin Protein (WAP) from *Chlorella protothecoides*. **Food and Chemical Toxicology**, 59, pp. 35–45.

Szeto, Y., Tomlinson, B., & Benzie, I. (2002). Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. **British Journal of Nutrition**, 87(1), pp. 55-59.

Takenaka, S., Sugiyama, S., Ebara, S., Miyamoto, E., Abe, K., Tamura, Y., et al. (2001). Feeding dried purple laver (nori) to vitamin B12-deficient rats significantly improves vitamin B12 status. **British Journal of Nutrition,** 85(6), pp. 699-703.

Thrane, M., Paulsen, P., Orcutt, M., & Krieger, T. (2017). Soy Protein: Impacts, Production, and Applications. In S. R. Nadathur, J. P. Wanasundara, & L. Scanlin, **Sustainable Protein Sources** (pp. 20-45). London, UK: Elsevier Inc.

Tian, H., & Chen, J. (2021). Food neophobia and intervention of university students in China. **Food Science & Nutrition**, 00, pp. 1-8.

Tilden, J. (1910). **Minnesota Algae** – Volume 1. Minneapolis: Authority of the Board of Regents of the University for the People of Minnesota.

Tomaselli, L. (2004). The Microalgal cell. In. A. Richmond, **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, (pp. 3-19). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Company.

Trainor, F., Cain, J., & Shubert, L. (1976). Morphology and nutrition of the colonial green alga, *Scenedesmus*: 80 years later. **Bot. Rev**., 42, pp. 5-25.

Urala, N. (2005). **Functional foods in Finland. Consumers: Views, attitudes and willingness to use.** Academic Dissertation. VTT Publication. pp. 581.

Urala, N., & Lähteenmäki, L. (2003). Reasons behind consumers' functional food choices. **Nutrition & Food Science,** 33(4), pp. 148-158.

Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2020). Influence of microalgae addition in formulation on colour, texture, and extrusion parameters of corn snacks. **Food Science and Technology International**, 26(8), pp. 685-695.

Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., Reino-Moyón, J., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2021). Effect of microalgae (*Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*) addition on 3D printed cookies. **Food Biophysics**, 16(1), pp. 27-39.

Vaibhav, V., & Sahasrabuddhe, A. (2018). 'BLUE' is the new 'GREEN' for Cosmetic Industry. **International Journal for Research Trends and Innovation**, 3(10), pp. 134-144.

Van Kleef, E., van Trijp, H. C., & Luning, P. (2005). Functional foods: Health claim food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. **Appetite**, 44(3), pp. 299-308.

Van wychen, S., & Laurens, L. M. (2015). Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass. NREL/TP-5100-60956. Golden, CO: **National Renewable Energy Laboratory.**

Vecchio, R., Van Loo, E. J., & Annunziata, A. (2016). Consumers' willingness to pay for conventional, organic and functional yogurt: Evidence from experimental auctions. **International Journal of Consumer Studies**, 40(3), pp. 368-378.

Wang, A. Y., Yan, K., Chu, D., Nazer, M., Lin, N.T., Samaranayake, E., Chang, J. (2020). Microalgae as a Mainstream Food Ingredient: Demand and Supply Perspective. In M. Alam, J.-L. Xu, & Z. Wang (Eds.), **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products** (pp. 29–79). Singapore: Springer.

Wang, G., L. Shen and C. Sheng. (2012). Characterization of biomass ashes from power plants firing agricultural residues. **Energy and Fuels**. 26(1): 102-111.

Wang, Q., Song, H., Liu, X., Liu, B., Hu., Z., & Liu, G. (2019). Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella sensu lato* (*Scenedesmaceae, Sphaeropeales*), including the description of three new species and two new varieties. **J. Phycol**., 55, 1290-1305.

Wang, Y. K., Stevenson, R. J., & Metzmeier, L. (2005). Development and evaluation of a diatom-based index of Biotic Integrity for the Interior Plateau Ecoregion, USA. **J. N. Am. Benthol. Soc.,** 24, pp. 990–1008.

Wansink, B., Westgren, R. E., & Cheney, M. M. (2005). Hierarchy of nutritional knowledge that relates to the consumption of a functional food. **Nutrition**, 21(2), pp. 264–268.

Watanabe, F., & Bito, T. (2018). Vitamin B12 sources and microbial interaction. **Exp. Biol. Med**., 243, pp. 148–158.

Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., & Miyamoto, E. (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**., 48, pp. 325–331.

Watanabe, F., Yabuta, Y., Bito, T., & Teng, F. (2014). Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. **Nutrients**, 6, pp. 1861–1873.

Watts, B., Ylimaki, G. Jeffery, L., & Elias, L. (1989). **Basic Sensory Methods for Food Evaluation**. Ottawa, Ontario, Canada: International Development Research Centre.

Wells, M., Potin, P., Craigie, J., Raven, J., Merchant, S., Helliwell, K., et al. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **J Appl Phycol.**, 29, pp. 949–82.

Whitcroft, K., Cuevas, M., Haehner, A., & Hummel, T. (2017). Patterns of olfactory impairment reflect underlying disease etiology. **The Laryngoscope**, 127, pp. 291–295.

WHO. (2022). **The Global Health Observatory-Noncommunicable diseases**. Retrieved 2019, from Organization World Health: https://www.who.int/data/gho/data/themes/noncommunicable-diseases

Will, K. W., & Rubinoff, D. (2004). Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**, 20, pp. 47–55.

Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinegris, D., Bosma, R., Wijffels, R., & Harmsen, P. (2011). **Microalgae: the green gold of the future? Large-Scale Sustainable Cultivation of Microalgae for the Production of Bulk Commodities**. Wageningen: Propress.

Woortman, D., Fuchs, T., Striegel, L., Fuchs, M., Weber, N., Brück, T., et al. (2020). Microalgae a superior source of folates: Quantification of folates in halophile microalgae by stable isotope dilution assay. **Frontiers in bioengineering and biotechnology,** 7, p. 481.

Wright, T., & Lackey, R. (2008). **Definitions of feed manufacturing and livestock nutrition terms**. Ontario Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs, Factsheet order no. 08–039 AGDEX 400/50.

Wu, J., Liu, C., & Lu, Y. (2017). Preparative separation of phytosterol analogues from green alga *Chlorella vulgaris* using recycling counter-current chromatography. **J. Separ. Sci.**, 40, pp. 2326–2334.

Wu, K., C. TSAI, C. CHEN and H. CHEN. (2012). The characteristics of torrefied microalgae. **Applied Energy**. 100(C): 52 – 57.

Yamaguchi, K. (1997). Recent advances in microalgal bioscience in Japan with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology.** 8, pp. 487-502.

Yan J, Shamim T, Chou SK, Desideri U, & H., L. (2017). Clean, efficient and affordable energy for a sustainable future. **Applied Energy**, 185(2), pp. 953–962.

Yang, E. C., Noh, J. H., Kim, S., & Choi, D. H. (2020). Plastid-encoded gene comparison reveals usefulness of atpB, psaA, and rbcL for identification and phylogeny of plastid-containing *cryptophyte* clades. **Phycologia**, 59(2), pp. 154-164.

Yang, N., Zhang, Q., Chen, J., Wu, S., Chen, R., Yao, L., . . . Zhang, Z. (2023). Study on bioactive compounds of microalgae as antioxidants in a bibliometric analysis and visualization perspective. **Front. Plant Sci.**, 14, p. 1144326. doi:10.3389/fpls.2023.

Yusof, Y.A., J.H. Basari1, N.A. Mukti1, R. Sabuddin, A. Razak, S. Sulaiman, S. Makpol1 and W. Ngah. (2011). Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. **Afr. J. Biotechnol**. 10: 13536-13542

Zhao, J.-b., Gao, Z.-b., Li, Y.-x., Wang, Y.-l., Zhang, X.-y., & Zou, L.-q. (2020). The food neophobia scale (FNS): Exploration and confirmation of factor structure in a healthy Chinese sample. **Food Quality and Preference**, 79(103791), pp. 1-5.

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. **Organisms Div. Evol**., 11, pp. 173–92.

Zydenbos, S., & Humphrey-Taylor, V. (2003). Biscuits, cookies, and crackers: Nature of the Products. **Encycl. Food Sci. Nutr**., pp. 524–528.

الملحق

Appendix

استمارة اختبار رهاب الأغذية الجديدة

	موافق بشدة	موافق	حيادي	غير موافق	غير موافق بشدة
أتناول عينات من الأطعمة الجديدة والمختلفة دائماً I am constantly sampling new and different foods					
لا أثق بالأطعمة الجديدة I don’t trust new foods.					
إذا لم أعرف ما هي مكونات الطعام، فلن أجربه If I don’t know what is in a food, I won’t try it					
أحب الأطعمة من البلدان المختلفة الأخرى I like foods from different countries					
يبدو الغذاء العرقي غريباً جداً لأتناوله Ethnic food looks too weird to eat					
في الولائم، أحاول تناول الطبق الجديد بالنسبة لي At dinner parties, I will try a new food					
أخشى أن أتناول أشياء لم يسبق لي أن أكلتها من قبل I am afraid to eat things I have never had before					
أنا متحفظ جداً بالنسبة للأطعمة التي أتناولها I am very particular about the foods I will eat					
أتناول أي شيء تقريباً I will eat almost anything					
أحب تجربة المطعم العرقي الجديد I like to try new ethnic restaurant					
أتناول الطعام الصحي الجديد إذا كان مقبولاً نوعاً ما					

من فضلك يرجى مراعاة ما يلي:

- لابد من شرب الماء بين كل تذوق لغسل الفم من الطعوم السابقة

- لا تتواصل مع غيرك من الذواقة

استمارة تقييم لاختبار الأفضلية والقبول

الاسم: **الجنس:** ذكر أنثى **المؤهل العلمي:**

العمر: **مدخن:** لا نادراً بشكل معتدل كثيراً

أمامك عينات مختلفة من البسكويت، من فضلك تذوّقها وقيّم كل منها واضعاً إشارة (X) أمام الخيار المناسب لك.

رقم العينة	المعيار الحسي	سلم التقييم				
		أحببته كثيراً	أحببته	حيادي	ما أحببته	ما أحببته أبداً
1	اللون					
	الرائحة					
	المذاق					
	القوام					
	الإحساس بعد المضغ					
	القبول العام					
2	اللون					
	الرائحة					
	المذاق					
	القوام					
	الإحساس بعد المضغ					
	القبول العام					
3	اللون					
	الرائحة					
	المذاق					
	القوام					
	الإحساس بعد المضغ					
	القبول العام					
4	اللون					
	الرائحة					
	المذاق					
	القوام					
	الإحساس بعد المضغ					
	القبول العام					

أي العينات هي الأفضل برأيك؟ ولماذا؟

أي العينات هي الأسوأ برأيك؟ ولماذا؟

استمارة اختبار تحديد موقف المستهلك

بعد تذوقك للعينات هل ستقوم بشراء المنتج؟ وإلى أي درجة؟ ضع إشارة X أمام الخيار المناسب.

رقم العينة	سأشتريه حتماً	احتمال أشتريه	لا أدري	احتمال ألا أشتريه	لن أشتريه
1					
2					
3					
4					

Abstract

The need for healthy foods from various sources have been rising to improve nutritional well-being and prevent food-related diseases. Microalgae showed its usefulness in that, and defining algae became necessary when announcing a commercial algae product that has a unique feature specific to the species of algae it contains, so this work aimed to confirm the identification of a pre-identified morphologically *Chlorella vulgaris*; isolated from local fresh water, by molecular methods. Also, it is aimed to study using the algal dry biomass as a food fortified for biscuits. The research was conducted at the National Commission for Biotechnology, and the axenic species was taken from the Algae Technology Lab. A 629 bp fragment in 18S rDNA region was sequenced, and submitted to NCBI for an accession number OM019107; it was the first local contribution in a genetic database of algae. The results showed confirmation of the identity of the sample due to the similarity with the genus *Chlorella* by 99.8% and with the species *C. vulgaris* by 97.8%, that was supported by the morphological characteristics. The dried biomass of algae was added to the biscuits at ratios (1%, 3%, and 5%), and the percentages of moisture, protein, antioxidants, ash, and some vitamins and minerals were estimated in this mass and in both the control and fortified biscuits. The results revealed that the algal mass was rich in protein (40.54%), and ash (11%) with high K, P, and Fe, and its antioxidant capacity achieved 2.37 times that of vitamin C (IC_{50} = 116 mg / ml), and its content of vitamin B_{12} (2.764 mg/g) and vitamin C (914.583 µg/g) was comparable to that found in plants. In biscuits, the moisture decreased by increasing algal biomass, which reduces the water activity and extends the storage period, and the fortified biscuits achieved a significant increase over the control for all components estimated; 100g fortified biscuits could exceed the control by meeting the daily value of protein (1.15 fold), vitamin C (4 fold), vitamin B_{12} (19 fold), K, Fe, MN, Cu and P (1.25, 8, 2, 6 and 2 fold, respectively), so it can be used (served) in case Fe deficiency, or for B_{12} deficiency associated with a vegetarian diet. Although the hedonic (sensory) test revealed a significant difference between the control and all other treatments, 5% fortified biscuits -the least acceptable one- received a high score (3/5). Accordingly, the dry biomass of *C. vulgaris* is a successful nutritional fortification for biscuits with minerals, protein, Vitamin B_{12}, C and antioxidants.

Key words: *Chlorella vulgaris, microalgae,* 18S rDNA, food support, biscuit.

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agriculture
Food Science Department

Study of using the Dry Biomass of Indigenous Isolated *Chlorella vulgaris* as a food additive

A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master in food science

By

Buthainah Nouri Alsalamah

Supervisors

Prof. Sameer Slik

Department of Food science
Faculty of Agriculture
Damascus University
Supervisor

Dr. Hussam Okkou

Department of Biodiversity
National Commission for Biotechnology NCBT
Co-supervisor

Damascus 15. 10. 2023