Name of Candidate: Diaa Attia Gab-Allah Marrez **Degree:** Ph.D.

Title of Thesis: Risk Evaluation During Production of Some Functional Ingredients from Algae in Egyptian Aquatic Ecosystems

Supervisors: Dr. Aziz Mohamed Aziz Higazy
Dr. Zakaria Yahia Daw
Dr. Mohamed Mahmoud Naguib

Department: Agricultural Microbiology **Approval:** 29 / 4 /2015

ABSTRACT

The aims of this work are production and risk evaluation of some functional ingredients from the dominants microalgae in Egyptian aquatic. These were achieved throughout the study of ingredients activity against pathogens and cancer cells. In addition to the assessment of the fuctional ingredients (amino acids, fatty acids, minerals and pigments) in *Spirulina platensis* as a model for the other species under study. Ninety eight species of phytoplankton from 4 different sites were identified to specify the dominant species. Six species were isolated and purified. Four of them (*Oscillatoria brevis, O. princeps, Microcystis aeruginosa* and *Spirulina platensis*) belonged to Cyanophyta and the other two (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*) belonged to Chlorophyta. Because of the ability to produce Microcystin, *O. brevis* and *M. aeruginosa* were excluded from the study.

Diethyl ether extract (DEE) of *C. vulgaris* gave the best inhibition being between 11.5 and 23.2 mm inhibition zone against all tested bacteria and fungi. Regarding to anticancer activity of DEE, the highest effect at LC_{50} was observed against both of HepG2 and MCF7 cell lines. Two compounds were identified as Hydroxyphenophytin B and Hexadecanoic acid Methyl ester. DEE of *S. obliquus* had the highest antimicrobial activity recording between 8.7 and 19.5 mm inhibition zones against bacteria and fungi. Also, low concentrations had anticancer effect at LC_{50} notably with HCT116 and HepG2 cell lines. Same trend recorded with previous two species, was observed with *O. princeps* which showed also the best bioactivity recording between 7.3 and 20.7 mm inhibition zone against all tested bacteria and fungi. Also, high activity was detected against cancer cell lines at LC_{50} especially MCF7 and HepG2 cell lines.

Similarly, DEE of *S. platensis* had the best inhibition effect recording between 8 and 27.3 mm inhibition zones against the tested bacteria and fungi. Also, low concentrations of DEE showed high reduction in HepG2 and HCT116 cells at $LC_{50.}$ Two pure compounds were identified as Hexadecanoic acid and 9-Octadecanoic acid methyl ester. *S. platensis* were cultivated in 4 different reported media in order to select the best medium for biomass production, pigments content and chemical composition. Modified BG-11 was chosen as the best medium cultivated in open system as well as closed system. Risk assessment of *Spirulina* from both system was evaluated (heavy metals, microbial load, natural toxins). Contaminants in *Spirulina* from both systems was within permissible limits. The effect of substitution of soybean by *Spirulina* in rabbits diets on meat quality was studied. The substitution 60% was the best one regarding to rabbits meat quality.

Key words: Microalgae, risk evaluation, function ingredients, microcystin, cancer cell lines, natural toxins.

DEDICATION

I dedicate this work to my PARENTS and my BROTHERS for all the support through my life. Also, I dedicate this work to my wife, my daughter Hoor and my son Mahmoud who have been a great source of motivation and inspiration.

ACKNOWLEDGEMENT

First of all thanks to ***Allah****, who blessed me with his unlimited graces.*

I owe special gratitude to ***Dr. Aziz Mohamed Higazy****, Prof. of Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his supervision, kind assistance, continuous guidance and encouragement throughout study. Without his assistance, none of this work would have been possible. My deep thanks to* ***Dr. Zakaria Yahia Daw****, Prof. of Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his encouragement, support, sincere advices and helpful supervision. I also would like to express my thanks, deepest gratitude to* ***Dr. Mohamed Mahmoud Naguib****, Researcher Prof. of Microbiology, National Research Centre, for his moral support and continuous guidance through writing and revision the manuscript of this thesis and his effort provided to achieve this work.*

Special thanks to ***Dr. Yousef Yasseen Sultan****, Researcher of Food Toxins, National Research Centre, for his continuous assistance, valuable suggestion, guidance through writing and revision the manuscript, valuable help and moral support that were vital to my success. Also, I would like to thank* ***Dr. Adel Mahmoud****, Assistant Prof. of Animal Nutrition, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his valuable help and plentiful advice in rabbits nutrition experiment.*

I would like to express my sincere thanks to ***Dr. Abo El-Khair B. El-Sayed****, Researcher Prof. of Algal Physiology, National Research Centre, for his valuable help and support. My deep thanks to* ***Dr. Shymaa S. Zaher****, Researcher of Phycology, National Institute of Oceanography for her valuable help in phytoplankton identification. Thanks are also extended to* ***Dr. Mohamed A. El-Raey****, Researcher of Natural Product Chemistry, National Research Centre, for interpretation of spectral data and structure elucidation of isolated compounds.*

Grateful appreciation is also extended to all staff members of Marine Toxins lab., Food toxins and contaminants Department, National Research Centre.

اسم الطالب: ضياء عطية جاب الله مريز **الدرجة:** دكتوراه

عنوان الرسالة: تقييم المخاطر أثناء إنتاج بعض المكونات الوظيفية من طحالب البيئة المائية المصرية

المشرفون : دكتور : عزيز محمد عزيز حجازى
دكتور : زكريا يحيى ضو
دكتور : محمد محمود نجيب

قسم: الميكروبيولوجيا الزراعية **تاريخ منح الدرجة:** ٢٩/ ٤ /٢٠١٥

المستخلص العربي

تهدف الدراسة إلى إنتاج وتقييم مخاطر بعض المكونات الوظيفية من الطحالب الدقيقة السائدة فى البيئة المائية المصرية وذلك من خلال دراسة النشاط المضاد للميكروبات (بكتريا ممرضة وفطريات)، وكذلك النشاط الحيوى لهذه المكونات على الخلايا السرطانية لكل من الكبد والقولون والثدى. بالإضافة إلى تقدير المكونات الوظيفية الأخرى (الأحماض الأمينية والدهنية والعناصر المعدنية والصبغات) الموجودة فى *Spirulina platensis* كنموذج لباقى السلالات المستخدمة فى الدراسة. تم تعريف ٩٨ نوع من الهائمات النباتية من أربع مناطق مختلفة بغرض التعرف على الأنواع السائدة، حيث تم عزل وتنقية وتعريف ٦ أنواع أربعة منها سيانوبكتريا وهى *Oscillatoria brevis* , *O. princeps*, *Microcystis aeruginosa*, *Spirulina platensis* ونوعين من الطحالب الخضراء وهما *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*. تم إستبعاد النوعين *M. aeruginosa*, *O. brevis* لإفرازهما للميكروسيستين.

أظهر المستخلص الإثيرى لـ *C. vulgaris* أعلى تثبيط حيث أعطى ما بين ١١,٥ و ٢٣,٢ مم قطر منطقة تثبيط تجاه البكتريا والفطريات المختبرة. أما بالنسبة للنشاط المضاد للخلايا السرطانية فأظهرت أفضل نشاط حيوى تجاه خلايا الكبد والثدى. تم فصل وتعريف Hydroxyphenophytin B و Hexadecanoic acid methyl ester. كسابقه فقد أظهر المستخلص الإثيرى لـ*S. obliquus* أفضل تثبيط تجاه البكتريا والفطريات المختبرة حيث أعطى ما بين ٨,٧ و ١٩,٥ مم قطر منطقة تثبيط. كما أظهرت تركيزات منخفضه منه نشاط حيوى تجاه الخلايا السرطانية لكل من القولون والكبد. أيضا أظهر المستخلص الإثيرى لـ *O. princeps* أعلى تثبيط حيث أعطى ما بين ٣,٧ و ٢٠,٧ مم قطر منطقة تثبيط ضد أنواع البكتريا والفطريات المختبرة. كما أظهرت تركيزات منخفضة منه نشاط حيوى تجاه الخلايا السرطانية للقولون والثدى فى حين تطلب تركيز أعلى تجاه خلايا سرطان الكبد.

أظهر المستخلص الإثيرى لـ *S. platensis* أعلى تثبيط حيث أعطى ما بين ٨ و ٢٧,٣ مم قطر منطقة تثبيط ضد أنواع البكتريا والفطريات المختبرة. أيضا أظهرت تركيزات منخفضة منة نشاط حيوى تجاه الخلايا السرطانية للكبد والقولون فى حين تطلب تركيز أعلى تجاه خلايا سرطان الثدى. تم التعرف على مركبين هما Hexadecanoic acid و 9-Octadecanoic acid methyl ester بصورة نقية والمعروفين بنشاطهما ضد البكتريا والفطريات. تم تنمية *S. platensis* فى أربع بيئات مختلفة وذلك بغرض التعرف على أنسب بيئة فى إنتاج الكتلة الحية والصبغات والتركيب الكيميائى، حيث كانت أفضلهم Modified BG-11 فى جميع المكونات ولذلك تم تنميتها فى النظام المفتوح ومقارنتها بالنظام المغلق. أيضا تم تقييم مخاطر *Spirulina* المنتجة من كل من النظام المغلق والمفتوح (العناصر الثقيلة والحمل الميكروبى والسموم الطبيعية) حيث كانت *Spirulina* المنتجة من كلا النظامين فى الحدود المسموح بها. تم إحلال *Spirulina* المنتجة من النظام المفتوح فى علف الأرانب كمصدر للبروتين بديل لكسب فول الصويا حيث أعطت نسبة الإحلال ٦٠% أعلى نتائج فى خصائص اللحم المنتج (نسبة البروتين والدهون والأحماض الدهنية الغير مشبعة والأحماض الأمينية الأساسية وغير الأساسية).

الكلمات الدالة: الطحالب الدقيقة، تقييم المخاطر، المكونات الوظيفية ، الميكروسيستين، الخلايا السرطانية، السموم الطبيعية.

RISK EVALUATION DURING PRODUCTION OF SOME FUNCTIONAL INGREDIENTS FROM ALGAE IN EGYPTIAN AQUATIC ECOSYSTEMS

By

DIAA ATTIA GAB-ALLAH MARREZ

B.Sc. Agric. Sci. (Animal production), Fac. Agric., Alex. Univ., 2002
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences
(Agricultural Microbiology)

Department of Agricultural Microbiology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2015

APPROVAL SHEET

RISK EVALUATION DURING PRODUCTION OF SOME FUNCTIONAL INGREDIENTS FROM ALGAE IN EGYPTIAN AQUATIC ECOSYSTEMS

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)

By

DIAA ATTIA GAB-ALLAH MARREZ

B.Sc. Agric. Sci. (Animal production), Fac. Agric., Alex. Univ., 2002
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010

APPROVAL COMMITTEE

Dr. EL-SHAHAT MOHAMED RAMADAN.....
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. OLFAT SAYED BARAKAT.....
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AZIZ MOHAMED AZIZ HIGAZY.....
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /

SUPERVISION SHEET

RISK EVALUATION DURING PRODUCTION OF SOME FUNCTIONAL INGREDIENTS FROM ALGAE IN EGYPTIAN AQUATIC ECOSYSTEMS

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)

By

DIAA ATTIA GAB-ALLAH MARREZ

B.Sc. Agric. Sci. (Animal production), Fac. Agric., Alex. Univ., 2002
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2010

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. AZIZ MOHAMED AZIZ HIGAZY
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ZAKARIA YAHIA DAW
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MOHAMED MAHMOUD NAGUIB
Researcher Professor of Microbiology, National Research Centre

تقييم المخاطر أثناء إنتاج بعض المكونات الوظيفية من طحالب البيئة المائية المصرية

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

ضياء عطية جاب الله مريز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (إنتاج حيوانى)، كلية الزراعة، جامعة الاسكندرية، ٢٠٠٢
ماجستير في العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠١٠

لجنة الإشراف

الدكتور/ عزيز محمد عزيز حجازى
أستاذ الميكروبيولوجيا - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ زكريا يحيى ضو
أستاذ الميكروبيولوجيا - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ محمد محمود نجيب
أستاذ باحث الميكروبيولوجيا - المركز القومي للبحوث

تقييم المخاطر أثناء إنتاج بعض المكونات الوظيفية من طحالب البيئة المائية المصرية

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

ضياء عطية جاب الله مريز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (إنتاج حيوانى)، كلية الزراعة، جامعة الاسكندرية، ٢٠٠٢
ماجستير في العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠١٠

لجنة الحكم

د. الشحات محمد رمضان.....
أستاذ الميكروبيولوجيا – كلية الزراعة – جامعة عين شمس

د. ألفت سيد بركات.....
أستاذ الميكروبيولوجيا – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. عزيز محمد عزيز حجازى.....
أستاذ الميكروبيولوجيا - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

التاريخ / /

تقييم المخاطر أثناء إنتاج بعض المكونات الوظيفية من طحالب البيئة المائية المصرية

رسالة مقدمة من

ضياء عطية جاب الله مريز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (إنتاج حيوانى)، كلية الزراعة، جامعة الاسكندرية، ٢٠٠٢
ماجستير في العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠١٠

للحصول على درجة

دكتوراه الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

قســـــم الميكروبيولوجيا الزراعية
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠١٥

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**5**
1. Microalgae	**5**
2. Cultivation and production of microalgae	**6**
3. Harvesting and processing of microalgae	**8**
4. Nutritional value of microalgae	**9**
5. Applications of microalgae	**11**
6. *Spirulina* as a source of functional ingredients	**23**
MATERIALS AND METHODS	**35**
1. Sampling locations	**35**
2. Microalgae isolation, purification and identification	**37**
3. Culture media	**39**
4. Toxicity assessment of isolated microalgae species	**40**
5. Preparation of microalgae extracts	**42**
6. Antimicrobial and anticancer bioassays	**43**
7. Fractionation and isolation of bioactive compounds	**48**
8. Structure elucidation of isolated bioactive compounds	**51**
9. Effect of cultivation media on functional ingredients content in *S. platensis*	**54**
10. Risk evaluation of *S. platensis* from open and closed systems	**60**
11. Effect of substitution soybean by *S. Platensis* in rabbit diet	**67**

Page

12. Statistical analysis..... **70**

RESULTS AND DISCUSSION..... **71**

1. Phytoplankton profile in Egyptian aquatic ecosystems **71**

2. Toxicity assessment of isolated microalgae species..... **73**

3. Solvent extraction of function compounds from microalgae **77**

4. Bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*..... **79**

5. Bioactive compounds from *Scenedesmus obliquus*..... **115**

6. Bioactive compounds from *Oscillatoria princeps*..... **131**

7. Bioactive compounds from *Spirulina platensis*..... **148**

8. Effect of cultivation media on functional ingredients content in *S. platensis*..... **184**

a. *S. platensis* Biomass production..... **184**

b. Pigments contents..... **186**

c. Chemical composition of *S. platensis*..... **193**

9. Risk evaluation of *S. platensis* from open and closed systems..... **202**

10. Effect of substitution soybean by *S. Platensis* in rabbit diet..... **215**

SUMMARY..... **225**

REFERENCES..... **231**

APPENDIX

ARABIC SUMMARY

Appendix 1

Table 1. Phytoplankton profile (x 10^2 unit l^{-1}) in some Egyptian Aquatic ecosystems.

No	Phytoplankton species	I	II	III	IV
Chlorophyta					
1	*Actinastrum lagerheim*	4	0	100	0
2	*A. hantzschii*	0	22	126	0
3	*A. convolutes* (Corda)	6	23	0	0
4	*Chlorella pyrenoidsa*	7	0	123	0
5	*C. variabilis*	12	0	86	0
6	*C. vulgaris*	6	0	352	0
7	*Coelastrum microporum* Naegeli	9	45	54	0
8	*C. quadrata* Morren	4	0	74	0
9	*C. rectangularis* (A.Braun) Gray	45	33	41	0
10	*Micractinium pusillum*	0	0	0	74
11	*O. bergi*	0	0	0	32
12	*Oocystis nephrocytioides* Naegeli	6	58	0	92
13	*Pediastrum sturmii* var. *radians* (Lemmer.)	0	8	15	0
14	*P. tetras* (Ehrenberg) Ralfs	23	0	41	0
15	*P. clathratum* (Schroter) Lemmer.	6	0	95	0
16	*P. duplex* Meyen	23	35	0	0
17	*P. obtusm* Lucks	22	6	0	0
18	*Scenedesmus acuminatus*	0	0	0	109
19	*S. quadricauda* (Trup.)de Brebisson	20	54	122	0
20	*S. ecornis* (Ehr.)Chodat	30	0	114	0
21	*S. opliensis* Richter	18	0	33	0
22	*S. parisiensis* Chodat	2	0	118	0
23	*S. obliquus* (Turpin) Kuetzing	23	138	390	0
24	*S. opoliensis* var. *opoliensis* P. Richter	14	62	23	0
25	*S. quadricauda* var. *longispina* Chodat	20	104	124	2
26	*S. dimorphus* (Turpin) Kuetzing	18	2	0	144
27	*S. bibraianum* Reinsch	12	5	0	0
28	*S. ellipticus*	0	0	0	155
29	*S. raciborskii*	0	0	0	122
30	*Spirogyra varians*	0	0	0	95
31	*Tetraedron minimum* (A. Br.) Hansgrig	0	44	0	0
32	*Volvox tertius* A. Meyer	0	52	0	0

Continued

Table 1. Continued

No	Phytoplankton species	I	II	III	IV
Cyanophyta					
33	*Aphanocapsa montana*	0	0	42	0
34	*Anabaena variabilis* Kuetzing	22	22	0	54
35	*Anabaena circinalis* Rabenhorst	6	0	0	0
36	*A. flos- aquae* Brebisson	8	0	0	0
37	*A. inaequalis* (Kutzing) Bornet & Flahawt	12	0	0	0
38	*Aphanocapsa montana*	14	9	0	0
39	*Chroococcus limneticus*	0	0	33	0
40	*Chroococcus minitus* (Kutzing) Nageli	2	11	18	0
41	*C. tenax*	5	8	38	0
42	*C. turgidus* (Kutzing) Naegeli	14	9	35	0
43	*Gloeocapsa polydermatica*	99	0	0	0
44	*Lyngbya distincta*	8	0	0	0
45	*Merismopedia elegans* A.Braun	2	4	6	3
46	*Merismopedia glauca*	33	7	4	0
47	*M. minima*	2	0	0	0
48	*M. major* (G. M. smith) Geitler	0	0	14	0
49	*M. tenuissima* Lemmermann	33	0	13	0
50	*Microcystis aeruginosa* Kutzing	160	900	1200	0
51	*M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner	0	0	1120	0
52	*M. elongata*	12	24	0	0
53	*Nostoc verrucosum* (Vaucher) Hist.	22	26	3	0
54	*N. pruniforme* C.A. Agardh	21	31	0	0
55	*N. carneum* Ag.	2	0	26	0
56	*Oscillatoria brevis*	775	34	0	3
57	*Oscillatoria foromsa* Bory	3	7	0	3
58	*O. limnetica*	0	9	14	32
59	*Oscillatoria princeps* Vaucher	890	6	32	0
60	*Phormidium molle* (Kutzing) Gomont	14	77	9	0
61	*Phormidium retzii*	4	0	0	0
62	*Spirulina jenneri*	0	22	0	66
63	*Spirulina major*	3	9	14	11
64	*S. platensis* (Nordstedi) Geitler	8	34	33	10160

Continued

Table 1. Continued

No	Phytoplankton species	I	II	III	IV
Bacillariophyta					
65	*Achnanthes flexella* (Kutzing) Brun.	28	19	0	0
66	*A. lanceollata* (Breb.) Grunow	24	26	0	0
67	*A. inflata*	0	0	0	12
68	*A.jamalinensis*	0	0	0	23
69	*Cocconeis pediculus*	0	0	0	3
70	*Cyclotella meneghiniana* kutz.	34	44	14	0
71	*C. operculata* kutz.	8	38	6	0
72	*C. ocellata* Pant	12	37	18	31
73	*C. glomerata* Bachmann	14	0	12	102
74	*C. kutzingiana* Thwaites	9	0	12	0
75	*C. bodanica* Eulenst	6	0	8	0
76	*C. antiqua* W.Smith	77	4	88	0
77	*Cymatopleuro solea*	0	0	0	14
78	*Cymbella enherenbergii*	0	0	0	6
79	*C. microcephala*	0	0	0	52
80	*Fragilaria lyngbya*	14	0	27	0
81	*F. construens* (Ehr.) Grun	8	72	9	0
82	*F. gracillima* Mayer	24	6	30	0
83	*F. brevistriata* Grun	16	0	40	0
84	*Melosira granulata* (Ehr.) Ralfs	24	4	33	0
85	*M. granulata* var. *angustissma* Muller	45	55	14	0
86	*Navicula cardinalis* Ehrenberg	0	7	0	0
87	*N. viridula* (Kutz.)	0	3	0	0
88	*Nitzshchia acicularis* W. Smith	0	15	0	0
89	*N. obtusa* W. Smith	21	5	0	0
90	*Pleurosigma elongatum*	0	0	0	34
91	*Stephanodiscus hantzschii* Grun	12	0	0	0
92	*Surirella robusta* Turpin	14	93	0	0
93	*Synedraulna acus* Kutz.	13	14	18	44
94	*S. affinis* Kutz.	4	0	18	0
95	*S. ulna* var. *aequalis* (Kutz.) Hust	8	34	14	0
96	*S. gaillonii* (Bory) Ehr.	14	0	16	0
97	*S. ulan* var. *oxyrhynchus* (Kutz.)Van Heurck	17	34	6	0
98	*S. actinastroides* Lemmermann	12	32	11	0

I: Kafr El-Zayat, II: El-Rasua, III: Wadi El-Rayian, IV: El-Khadra Lake