



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**Παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από ετερότροφα συστήματα
καλλιέργειας του μικροφύκου *Cryptocodinium conhi*
χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα**

Κωστόπουλος Παναγιώτης

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

(Α.Μ. 05112083)

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος, Επ. Καθηγητής, ΕΜΠ

Συνεπιβλέπων: Καρναούρη Ανθή, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια, ΕΜΠ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019

Στην οικογένεια μου..

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Επ. Καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα.

Αυτός είναι και ο άνθρωπος που θέλω να ευχαριστήσω πρωτίστως, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε μέσω της ανάθεσης της εργασίας. Ένας εξαιρετός ακαδημαϊκός, αστείρευτης θετικής ενέργειας, πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να καθοδηγήσει. Ελπίζω να συνεχίσει το όμορφο έργο του και να βρει την ηρεμία μέσω της επιστημονικής ανησυχίας.

Το δεύτερο εξίσου μεγάλο «ευχαριστώ» ανήκει στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Ε.Μ.Π. Ανθή Καρναούρη. Αρχικά, για την υπομονή και κατανόηση που υπέδειξε κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου, αλλά και για την ευχάριστη και εξαιρετική συνεργασία που αναπτύξαμε. Ευχαριστώ από καρδιάς για την προθυμία, την ηθική υποστήριξη αλλά και την ουσιαστική της καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας μου, ανεξαρτήτου ώρας, ημέρας και τοποθεσίας.

Ακόμα, θα ήθελα να αναφέρω την πολύτιμη βοήθεια του κ. Κωσταντίνου Καλογιάννη, ο οποίος μας παρείχε προκατεργασμένες βιομάζες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Ε.Μ.Π., και ειδικότερα τους υποψήφιους διδάκτορες για την ουσιαστική βοήθεια τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την αγάπη τους, που με συντροφεύουν σε όλα τα βήματα που ακολουθώ.

*Γάνος
Σεπτέμβριος, 2019*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο για την παραγωγή ευρέως φάσματος προϊόντων υψηλής αξίας που χρησιμοποιούνται σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας. Η παραγωγή ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) κρίνεται ως ιδιαίτερα ελκυστική τεχνολογία, καθώς τα εν λόγω έλαια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυοξενοϊκό οξύ (DHA) τα οποία είναι ευρέως αναγνωρισμένα ως σημαντικά διατροφικά στοιχεία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικά σκευάσματα και συμπληρώματα διατροφής με στόχο τη βελτίωση της υγείας των καταναλωτών και την πρόληψη ασθενειών. Ετεροτροφικά συστήματα θαλάσσιων μικροφυκών της συνομοταξίας των Δινομαστιγωτών, όπως εκείνα του είδους *Cryptocodinium cohnii*, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας διάφορες πηγές άνθρακα (όπως γλυκόζη) και να συσσωρεύουν υψηλά ποσοστά λιπαρών οξέων στο εσωτερικό τους.

Ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων καλλιέργειας μικροφυκών για τη μετατροπή φθηνών οργανικών πηγών άνθρακα (λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα και συγκεκριμένα πριονίδια ξύλου οξιάς) σε πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα μέσω διεργασιών μικροβιακών ζυμώσεων με κύτταρα του μικροφύκου *C. cohnii*. Πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική προκατεργασία ήπιας οργανολυτικής κλασμάτωσης του υλικού με τη χρήση οργανικών διαλυτών, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή στερεού κλάσματος με υψηλό ποσοστό ανάκτησης κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση και τα σάκχαρα που παράχθηκαν αξιοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από τα κύτταρα του μικροφύκου σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας, σε σύστημα ανακινούμενων φιαλών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα σάκχαρα από την υδρόλυση της βιομάζας έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την απόδοση των παραγόμενων προϊόντων, με τα συνολικά λιπαρά να φτάνουν σε ποσοστό ως και 22.6% του ξηρού βάρους των κυττάρων. Η παραγωγή των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, και συγκεκριμένα του DHA, έφτασε μέχρι και 56.2% του βάρους των συνολικών λιπαρών οξέων, αφήνοντας περιθώρια προς περαιτέρω βελτίωση των συνθηκών της καλλιέργειας σε σάκχαρα προερχόμενα από τη βιομάζα και λαμβάνοντας υπόψιν τυχόν αναστολή της ανάπτυξης των μικροφυκών από ενώσεις-παρεμποδιστές που δημιουργούνται στο υδρόλυμα της βιομάζας μετά την προκατεργασία.

Η χρήση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ω-3 λιπαρά οξέα, προσφέρει μια οικονομικά ανταγωνιστική και συμφέρουσα εναλλακτική σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες τεχνολογίες και προάγει τη βιωσιμότητα και την αειφόρο ανάπτυξη.

ABSTRACT

Microalgae are cultivated worldwide to produce a wide range of high value products, which are used in many industries. The production of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) is a particularly attractive technology as these oils have a high content of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) which are both widely recognized as important dietary nutrients and can be used as nutritional supplements to improve consumer health and prevent diseases. Heterotrophic cultivation of dinoflagellates, such as those of *Cryptocodinium cohnii*, can grow using various carbon sources (such as glucose) and accumulate high fatty acids within them.

The aim of this work was to develop effective microbial heterotrophic culture methods for the conversion of cheap organic carbon sources (lignocellulosic substrates and particularly beech wood sawdust) into polyunsaturated omega-3 fatty acids by microbial fermentation processes of *C. cohnii* cells. Physicochemical pretreatment of mild organolytic fractionation of the material was carried out using organic solvents, at different temperatures and time conditions, in order to produce a solid fraction with a high rate of cellulose and hemicellulose recovery. Enzymatic hydrolysis was then carried out and the produced sugars were harvested as the carbon source to produce omega-3 fatty acids from the microalgae cells in small scale cultures, in a shake flask system.

The results showed that the hydrolyzed sugars from the biomass yielded satisfactory amounts of the products, with the percentage of the total fatty acids reaching up to 22.6% of the cell dry weight. Production of omega-3 fatty acid DHA, reached up to 56.2% by weight of total fatty acids, leaving room for further improvement of the cultivation conditions in biomass-derived sugars and considering any potential delay of growth, from inhibitor compounds created in biomass hydrolysis after pretreatment.

The use of lignocellulosic biomass to produce high value-added ingredients, such as omega-3 fatty acids, offers an economically competitive and advantageous alternative to existing technologies. In addition, it promotes sustainability and lasting development.

Keywords: *Cryptocodinium cohnii*, Microalgae, Dinoflagellates, PUFAs, DHA, Fatty acids, Omega-3, Heterotrophic cultivation, Lignocellulosic biomass, Fermentation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
Abstract.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vi
Κατάλογος Εικόνων	ix
Κατάλογος Διαγραμμάτων	x
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομεύσεις.....	xii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	xiv
1.1 ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.2 ΛΙΠΙΔΙΑ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	2
.....	6
1.3 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα - Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)	6
1.3.1 Σημασία PUFAs στα ψάρια και τις υδατοκαλλιέργειες.....	10
1.3.2 Σημασία των PUFAs στον άνθρωπο	13
1.4 Πηγες PUFAs.....	16
1.4.1 Ιχθυέλαιο.....	16
1.4.2 Έλαια μονοκύτταρων οργανισμών.....	19
1.4.3 Μικροοργανισμοί.....	21
1.4.4 Μικροοργανισμοί ως πηγή DHA	22
1.5 <i>Cryptocodinium conhii</i>	30
1.6 Βιοχημεία λιπιδίων	32
1.7 Εναλλακτικες πηγές άνθρακα σε ετεροτροφα συστημα καλλιεργειας του <i>cryptocodinium conhii</i>	38
1.8 Η ΦΥΤΙΚΗ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ PUFAs.....	41
1.8.1 Λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα.....	41
1.8.2 Κύρια συστατικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	42
1.8.2.i Κυτταρίνη.....	43
1.8.2.ii Ημικυτταρίνη	45
1.8.2.iii Λιγνίνη.....	46
1.8.3 Υδρόλυση της βιομάζας.....	48

1.8.4 Μέθοδοι προκατεργασίας βιομάζας	48
1.8.5 Ενζυμική υδρόλυση υδατανθράκων για την παραγωγή σακχάρων	52
1.8.5.i Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης	52
1.8.5.ii Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
2.1 Όργανα	55
2.2 Χημικά Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά – Στήλες Χρωματογραφίας	56
2.3 Ένζυμα και τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits)	56
2.4 Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffer solutions) και λοιπά διαλύματα	57
2.5 Μικροοργανισμοί.....	58
2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ & ΤΕΧΝΙΚΕΣ	59
2.6.1 Αέριος χρωματογράφος (GC)	61
2.6.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC)	62
2.6.3 Απομόνωση λιπαρών από λυοφιλωμένη βιομάζα καλλιέργειας κυττάρων... 62	
2.6.4 Προετοιμασία μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων , (Fatty Acid Methyl Esters FAMES) προς ανάλυση.....	63
2.7 Λογισμικά & λειτουργικά συστήματα	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
3.1.1 Κυτταρική ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και παρουσία φαινολικών χαρακτηριστικών ομάδων.....	67
3.1.2 Μελέτη της επίδρασης του όγκου φιάλης και της αλατότητας, στην απόδοση υδρολυτικής ικανότητας κυτταρινασών	70
3.1.3 Μελέτη καλλιέργειας σε σύστημα ανακινούμενων φιαλών παρουσία διαφορετικών αναλογιών γλυκόζης – ξυλόζης (%).....	72
3.1.4 Μελέτη για ξυλόζη, ρυθμιστικό διάλυμα και για συνθήκες καλλιέργειας με pH: 5.5 σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών	75
3.1.5 Καλλιέργεια του <i>Crypthocodinium conhii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας “SE5: Corn Stover” σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών.....	80
3.1.6 Καλλιέργεια του <i>Crypthocodinium conhii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση διαφορετικών βιομαζών σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών	82

3.1.7 Συγκεντρώσεις πηγών άνθρακα (γλυκόζη) και αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) ως παράμετροι της καλλιέργειας	84
3.1.8 Καλλιέργεια του <i>Crypthecodinium conhii</i> σε μείγμα σακχάρων προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση δύο διαφορετικών βιομαζών σε ημιτροφοδοτούμενο (fed-batch) σύστημα	85
3.1.9 Καλλιέργεια του <i>Crypthecodinium conhii</i> σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση διαφορετικών βιομαζών σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	98
5.1.1 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Crypthecodinium conhii</i>	99
5.1.2 Δεδομένα ενζύμου κυτταρινασών, που χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο της υδρόλυσης	101
5.1.3 Καμπύλες αναφοράς.....	102
5.1.4 Στοιχεία για τον μικροοργανισμό <i>Crypthecodinium conhii</i> (ATCC® 30722™)	104
5.1.5 Στοιχεία για τον θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του <i>Crypthecodinium conhii</i> ATCC® Medium 460: A2E6 medium	105
.....	107
5.1.6 Συμμετοχές σε συνέδρια/ δημοσιεύσεις	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΗΓΕΣ & ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Απεικόνιση διεργασίας παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων αξιοποιώντας τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα ως πρώτη ύλη.	2
Εικόνα 1.2 Τροφές με πολυακόρεστα λιπαρά (PUFAs) (πηγή).....	3
Εικόνα 1.3 Γενική δομή γλυκεροφωσφολιπιδίων (πηγή).....	4
Εικόνα 1.4 Δομή του εικοσιδυοξενοϊκού οξέος (DHA).....	9
Εικόνα 1.5 Απορρόφηση ιχθυελαίου από την αγορά για το 2016	11
Εικόνα 1.6 Παγκόσμια παραγωγή ιχθυελαίου για το 2016.....	12
Εικόνα 1.7 Κάψουλες πλούσιες σε ωμέγα-3 λιπαρά (FOA, Globefish Highlights, April 2019).....	14
Εικόνα 1.8 Τιμές ιχθυελαίου και σογιέλαιου για την περίοδο 1984-2006 (Josupeit, 2006)	17
Εικόνα 1.9 Τιμές παγκόσμιας αγοράς ιχθύων	18
Εικόνα 1.10 Φωτοβιοαντιδραστήρας Phycos-Flow™, Varicon Aqua.....	24
Εικόνα 1.11 Υδατοδιάδρομοι καλλιέργειας μικροφυκών (πηγή).....	25
Εικόνα 1.12 Κύτταρα του <i>C.conhii</i> κατά τη φάση λιπογένεσης.....	27
Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση του <i>Cryptocodinium conhii</i> (Perret et al. (1991).....	29
Εικόνα 1.14 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) του <i>C.conhii</i> , σε διαφορετικές μορφές και λήψεις, κλίμακα μπάρας: 5μm (Prabowo et al., 2013).....	31
Εικόνα 1.15 Κύτταρα <i>C.conhii</i>	32
Εικόνα 1.16 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης λιπαρών οξέων (Guangsheng Pei. et al.,2017)	34
Εικόνα 1.17 (πηγή)	38
Εικόνα 1.18 Απεικόνιση της αλυσίδας της κυτταρίνης (Marques-Marinho & Vianna-Soares 2013).....	43
Εικόνα 1.19 Δομή της φυτικής κυτταρίνης (πηγή)	45
Εικόνα 1.20 Διάφοροι μονοσακχαρίτες παρόντες.....	46
Εικόνα 1.21 Η δομή της λιγνίνης (Rangaswami G & P Bagyaraja. Agricultural Microbiology. 2nd. Prentice Hall of India, 1993).	47
Εικόνα 1.22 Ο ρόλος της προκατεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας.....	49
Εικόνα 1.23 Προκατεργασμένες λιγνοκυτταρινούχες βιομάζες.....	50
Εικόνα 1.24 Πώς υδρολύονται τα πολυσακχαρίδια των φυτών. (Α) Η ενζυματική διάσπαση της κυτταρίνης περιλαμβάνει τη κοινή δράση εξωγλυκανασών (CBHs), ενδογλυκανάσες (EGs) και β-γλυκοσιδασών. Οι CBHs διασπούν την κυτταρίνη κατά ένα μεταποιητικό τρόπο, απελευθερώνοντας κυρίως κελλοβιόζη από τα άκρα της κυτταρινικής αλυσίδας. Σε αντίθεση με τις CBHs, οι EGs μπορούν να ενεργήσουν και στη κυτταρίνη και στην ημικυτταρίνη. (Β) Η αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης περιλαμβάνει επίσης τη συνεργική δράση των διαφόρων ενζύμων και ενισχύει την ενεργότητα της κυτταρινάσης αυξάνοντας την προσπελάσιμη επιφάνεια κυτταρίνης.....	51
Εικόνα 1.25 Απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης κυτταρινάσων για την υδρόλυση της κυτταρίνης (Arantes, 2010)	53
Εικόνα 2.1 Δείγματα προς ανάλυση DNS σε microplate.....	60
Εικόνα 2.2 Αέριος χρωματογράφος GC-17A, SHIMADZU (Ιαπωνία).....	61
Εικόνα 2.3 Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC)	62
Εικόνα 5.1 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Cryptocodinium conhii</i>	99
Εικόνα 5.2 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου <i>Cryptocodinium conhii</i> 100	100
Εικόνα 5.3	101

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3-1 Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων	67
Διάγραμμα 3-2 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης	68
Διάγραμμα 3-3 Κυτταρική ανάπτυξη καλλιεργειών με καθαρή πηγή γλυκόζης και παρουσία φαινολικών..	68
Διάγραμμα 3-4 Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες με καθαρή πηγή γλυκόζης και παρουσία φαινολικών χαρακτηριστικών ομάδων	69
Διάγραμμα 3-5 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης από φιάλες διαφορετικού όγκου	71
Διάγραμμα 3-6 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης παρουσία και απουσία άλατος.....	72
Διάγραμμα 3-7 Κατανάλωση γλυκόζης και ξυλόζης, όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται παρουσία διαφορετικών συνδυασμών των δυο σακχάρων ως πηγή άνθρακα. Το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στο 6.7-7.2 για τις 100 ώρες της επώασης.	73
Διάγραμμα 3-8 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών, όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται παρουσία διαφορετικών συνδυασμών των δυο σακχάρων ως πηγή άνθρακα. Το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στο 6.7-7.2 για τις 100 ώρες της επώασης.	74
Διάγραμμα 3-9 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων	76
Διάγραμμα 3-10 Κυτταρική ανάπτυξη παρουσία υπερκάθαρου νερού και οξικού οξέος	76
Διάγραμμα 3-11 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων σε καλλιέργειες	77
Διάγραμμα 3-12 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειες	77
Διάγραμμα 3-14 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειες με διαφορετική αναλογία γλυκόζης – ξυλόζης (%)	78
Διάγραμμα 3-13 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων σε καλλιέργειες με διαφορετική αναλογία γλυκόζης – ξυλόζης (%).....	78
Διάγραμμα 3-15 Κατανάλωση γλυκόζης που προέκυψε από την υδρόλυση της βιομάζας “SE5”.....	81
Διάγραμμα 3-16 Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης	82
Διάγραμμα 3-17 Συγκέντρωση γλυκόζης μετά από	83
Διάγραμμα 3-18 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης.....	86
Διάγραμμα 3-19 Κυτταρική ανάπτυξη παρουσία μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης	87
Διάγραμμα 3-20 Κατανάλωση γλυκόζης μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης.....	87
Διάγραμμα 3-21 Κατανάλωση ξυλόζης μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης.....	88
Διάγραμμα 3-22 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών παρουσία μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης.....	88
Διάγραμμα 3-23 Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης.....	90
Διάγραμμα 3-24 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης	91

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Αναλογία (%) των λιπαρών οξέων σε φυτικά λίπη και έλαια	5
Πίνακας 1.2 Αναλογία (%) των λιπαρών οξέων σε ζωικά λίπη.....	6
Πίνακας 1.3 Λιπαρά οξέα που υπάρχουν στη φύση (de Swaaf, 2003)	7
Πίνακας 1.4 Κύρια λιπαρά οξέα διάφορων μικροοργανισμών και	20
Πίνακας 1.5 Σύγκριση διαφορετικών πηγών άνθρακα για παραγωγή DHA, μέσω καλλιέργειας του <i>C.conhii</i>	39
Πίνακας 1.6 Σύσταση μερικών λιγνοκυτταρινούχων υλικών	42
Πίνακας 3.1 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων	69
Πίνακας 3.2 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων παρουσία συνδυασμού γλυκόζης και ξυλόζης ως πηγή άνθρακα. Σε όλα τα πειράματα, ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 100 ώρες, ενώ η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν ίση με 25 g/L και η συγκέντρωση πηγής αζώτου ίση με 2 g/L.	73
Πίνακας 3.3 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων	79
Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα υδρολύσεων της βιομάζας “SE5” σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ξηρής βιομάζας.....	80
Πίνακας 3.5 Σχηματισμένα λιπαρά οξέα, μετά την κατανάλωση σακχάρων	81
Πίνακας 3.6 Συσσώρευση βιομάζας και λιπαρών οξέων παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης	83
Πίνακας 3.7 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πηγής άνθρακα (γλυκόζη) και αζώτου (εκχύλισμα ζύμης). Σε όλα τα πειράματα, ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 280 ώρες, ενώ στις 96 ώρες πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου ανά περίπτωση.....	85
Πίνακας 3.8 Συσσώρευση βιομάζας και λιπαρών οξέων παρουσία μείγματος υδρολυμάτων.....	88

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

AMP	Adenosine monophosphate
ARA	Arachidonic acid (20:4 n-6)
ATP	Adenosine triphosphate
ATTC	American type culture collection
CBD	Cellulose Binding Domain
CBH	Cellobiohydrolases
CD	Catalytic Domain
CDW	Cell dry weight
CMC	Carboxymethyl cellulose
DGLA	Dihomogammalinolenic acid (20:3 n-6)
DHA	Docosahexaenoic acid (22:6 n-3)
DPA-3	Docosapentaenoic acid (22:5 n-3)
DPA-6	Docosapentaenoic acid (22:5 n-6)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EG	Endonoglucanases
EFA	Essential fatty acids
EPA	Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3)
FA	Fatty acid
FAME	Fatty acid methyl esters
FAS	Fatty acid synthase
GC	Gas chromatography
GLA	γ -linolenic acid (18:3 n-6)
GRAS	Generally recognized as safe
HUFA	Highly unsaturated fatty acids
LA	Linoleic acid
LNA	α -linolenic acid (18:3 n-3)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PI	Phosphatidylinositol
PKS	Polyketide synthase
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
rDHA	DHA volumetric productivity (mg DHA/l/h)
rpm	Revolutions per minute
SCO	Single cell oils
TFA	Total fatty acids
TRIS	Tris hydroxymethyl aminomethane

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΗΓΕΣ & ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

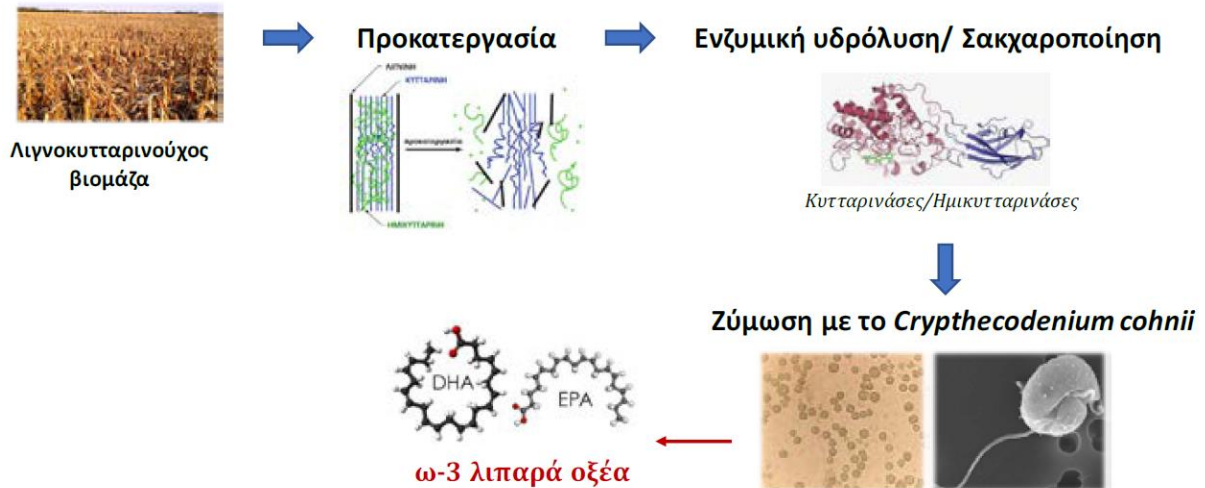
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο για την παραγωγή ευρέως φάσματος προϊόντων υψηλής αξίας που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων, την κοσμετολογία και σε λοιπές βιομηχανικές εφαρμογές. Η παραγωγή ωμέγα 3 (n-3) πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids (PUFAs), και ειδικότερα εκείνων με την ω-3 μακριά αλειφατική αλυσίδα (ω-3-long chain LC-PUFAs), από τα κύτταρα των μικροφυκών κρίνεται ως ιδιαίτερα ελκυστική τεχνολογία.

Τα εν λόγω έλαια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5n-3) και εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, 22:6n-3) τα οποία είναι ευρέως αναγνωρισμένα ως σημαντικά διατροφικά στοιχεία που συμβάλλουν στην πρόληψη νοσημάτων και προσφέρουν ποικίλα οφέλη μέσω της δράσης τους στη φυσιολογία του οργανισμού (σε μοριακό, κυτταρικό και μεταβολικό επίπεδο) (Trautwein, 2001). Επιπλέον, η χρήση τους έναντι των ιχθυελαίων αποτρέπει την εντατικοποίηση της αλιείας και εξαλείφει την πιθανότητα παρουσίας τοξικών μη μεταβολιζόμενων χημικών ουσιών όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και βαρέα μέταλλα. Τέλος, τα εν λόγω παρασκευάσματα έχουν καλύτερη οσμή και βελτιωμένες οργανοληπτικές ιδιότητες.

Ετεροτροφικά συστήματα θαλάσσιων μικροφυκών της συνομοταξίας των Δινομαστιγωτών (Dinoflagellata) έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, συσσωρεύοντας λιπαρά οξέα που φτάνουν ως και 40% του ξηρού βάρους (ξ.β.) των κυττάρων, ενώ η παραγωγή PUFAs, και συγκεκριμένα του DHA, μπορεί να φτάσει μέχρι και 70% του συνολικών λιπαρών οξέων. Επίσης, έχει δειχθεί πως τα μικροφύκη μπορούν επιτυχώς να αναπτυχθούν σε υδρόλυμα από την επεξεργασία της βιομάζας σε μια διεργασία που απεικονίζεται στην Εικόνα 1.1. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση παραγωγής λιπαρών οξέων που μπορεί να φτάσει ως και εκείνη στην οποία χρησιμοποιείται γλυκόζη στο μέσο καλλιέργειας ως πηγή άνθρακα (Zheng et al. & Joe et al., 2015), καθιστώντας έτσι τις υπολειμματικές μορφές βιομάζας ως κατάλληλο υπόστρωμα για την αξιοποίηση των μικροφυκών σε ευρεία κλίμακα.



Εικόνα 1.1 Απεικόνιση διεργασίας παραγωγής ω-3 λιπαρών οξέων αξιοποιώντας τη λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα ως πρώτη ύλη.

1.1 ΛΙΠΙΔΙΑ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

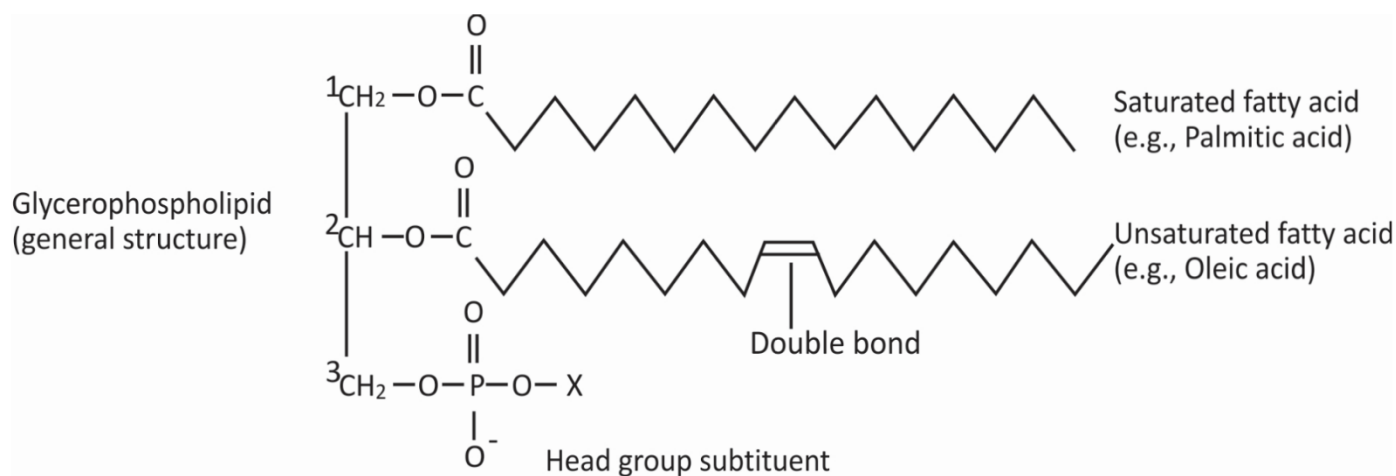
Τα λιπίδια αποτελούν ευρεία κατηγορία οργανικών ενώσεων που είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό, αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Μαζί με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες αποτελούν τα κύρια συστατικά της βιολογικής ύλης. Κυριότερα συστατικά των λιπιδίων αποτελούν τα λιπαρά οξέα, τα οποία απαρτίζονται από κεντρική αλειφατική αλυσίδα, προσδεμένη σε ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Στα βιολογικά συστήματα, τα λιπαρά οξέα συναντώνται ως συστατικά των λιπιδίων. Από χημική άποψη, τα λιπίδια ποικίλλουν σε τόσο μεγάλη έκταση ώστε δεν μπορεί να οριστεί διαρθρωτικός ορισμός (Gurr & Harwood, 1991). Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε απλά και σύνθετα λιπίδια. Τα σύνθετα λιπίδια (εστέρες λιπαρών οξέων που εκτός από την αλκοόλη και το λιπαρό οξύ περιλαμβάνουν και άλλες χαρακτηριστικές ομάδες). Τα απλά λιπίδια, όπως για παράδειγμα τα στεροειδή, δεν μπορούν να υδρολυθούν σε μικρότερα μόρια (McMurry 1988).



Εικόνα 1.2 Τροφές με πολυακόρεστα λιπαρά (PUFAs) ([πηγή](#))

Τα πιο γνωστά λιπίδια, οι ακυλο- και φωσφογλυκερόλες, βασίζονται στην εστεροποίηση της γλυκερόλης με τα λιπαρά οξέα. Οι φωσφογλυκερόλες αποτελούνται από έναν σκελετό γλυκερόλης εστεροποιημένο με δύο λιπαρά οξέα και μια φωσφορική ομάδα. Οι φωσφογλυκερόλες είναι πολυειδείς, καθώς εκτός από το ότι συνδέονται με τη ραχοκοκαλιά της γλυκερόλης, η φωσφορική ομάδα μπορεί να συνδεθεί με μία μεγάλη ποικιλία ομάδων (Gurr & Harwood 1991).

Τα φυσικά έλαια και λίπη αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες, ή αλλιώς, τριγλυκερίδια. Άλλα συστατικά, τα οποία βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες περιλαμβάνουν μόνο- και διακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, κηρούς (εστέρες αλκοολών υψηλού μοριακού βάρους με λιπαρά οξέα), στεροειδή και καροτενοειδή (Stauffer 1996). Τα περισσότερα φυσικά λιπαρά οξέα έχουν άρτιο αριθμό ανθράκων λόγω της βιολογικής διαδικασίας επιμήκυνσης λιπαρού οξέος όπου προστίθενται δύο άνθρακες κάθε φορά, με συνηθέστερο αριθμό ανθράκων, τους 18. Το εύρος του αριθμού ανθράκων στα λιπαρά οξέα ποικίλει μεταξύ 4 και 36, ωστόσο η πλειοψηφία στην φύση τους περιέχει 14 έως 24 άνθρακες. Η ανθρακική αλυσίδα μπορεί να είναι ευθύγραμμη ή διακλαδισμένη (Freeman, 2002).



Εικόνα 1.3 Γενική δομή γλυκεροφωσφολιπιδίων ([πηγή](#))

Η παρουσία ενός (ή και περισσότερων) διπλού/ών δεσμού/ών μεταξύ δύο μορίων άνθρακα της κεντρικής αλυσίδας, τα χαρακτηρίζει ως ακόρεστα. Οι πιο συχνοί διπλοί δεσμοί εμφανίζονται στις θέσεις C₉-C₁₀ και σπάνια ξεπερνάνε τους 6, σε συνολικό αριθμό. Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες οι οποίες ανακαλύψαν λιπαρά οξέα με 28 άτομα άνθρακα και 8 διπλούς δεσμούς 28:8(n - 3) σε είδη δινομαστιγωτών (Springer, 2005). Οι διπλοί δεσμοί των πολυακόρεστων λιπαρών, οξέων δεν είναι σχεδόν ποτέ γειτονικοί, καθώς μεταξύ τους παρεμβάλλεται μία μεθυλομάδα (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). Όλα σχεδόν τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στην φύση είναι γεωμετρικής ισομέρειας cis. Τα trans λιπαρά οξέα παράγονται κατά την υδρογόνωση ακόρεστων ελαίων ή στο στομάχι μηρυκαστικών ζώων κατά τη γλυκολιπίδια δράση βακτηρίων (N Engl J Med., 2006)

Αντίθετα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (με γενικό χημικό τύπο: CH₃(CH₂)_nCOOH) δεν εμφανίζουν κάποιον αντίστοιχο διπλό δεσμό και διαθέτουν συνήθως 18 - 22 μόρια άνθρακα. Προσδιορίζονται από το μήκος, την πολικότητα και το βαθμό κορεσμού της υδρογονανθρακικής αλυσίδας. Όσο μεγαλύτερο το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος και όσο λιγότεροι είναι οι διπλοί δεσμοί, τόσο μικρότερη είναι η διαλυτότητα της στο ύδωρ, λόγω μείωσης της πολικότητας. Τα σημεία τήξης επηρεάζονται από το μήκος και τον βαθμό κορεσμού της υδρογονανθρακικής αλυσίδας. Στους 25°C τα κορεσμένα λιπαρά οξέα από C₁₂ έως C₂₄ έχουν κηρώδη σύσταση ενώ τα ακόρεστα

λιπαρά οξέα αυτού του μεγέθους είναι ελαιώδη υγρά. Η διαφορά ως προς το σημείο τήξης οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό στοίχισης και δόμησης των μορίων των λιπαρών οξέων. Συνδέονται μεταξύ τους ή με άλλες υδρόφοβες ομάδες, όπως οι στερόλες. Οι υδρόφοβες αλυσίδες αμινοξέων, η βραχεία κεντρική αλυσίδα και η ακορεστότητα αυξάνουν τη ρευστότητα των λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους. Μη διακλαδισμένα λιπαρά οξέα περιγράφονται εν συντομία στη μορφή (x):(y), όπου το (x) φανερώνει τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και το (y) τον αριθμό των διπλών δεσμών. Η αρίθμηση πραγματοποιείται από το άκρο στο οποίο βρίσκεται η καρβοξυλομάδα. Η θέση των διπλών δεσμών δηλώνεται από το Δ και τον αριθμό που το συνοδεύει. Αυτός ο αριθμός καταδεικνύει τον πρώτο άνθρακα ο οποίος συμμετέχει στο σχηματισμό του διπλού δεσμού. Για παράδειγμα Δ12 20:1 υποδηλώνει ένα λιπαρό οξύ με 20 άτομα άνθρακα και ένα διπλό δεσμό στον 12^ο άνθρακα, απαριθμώντας από το καρβοξυλικό άκρο.

Πίνακας 1.1 Αναλογία (%) των λιπαρών οξέων σε φυτικά λίπη και έλαια

Λιπαρά Οξέα	Σογιέ- λαιο	Ηλιαν- θέλαιο	Κραμ- βέλαιο	Βαμβα- κέλαιο	Αραβο- σιτέλαιο	Σησαμέ- λαιο	Κακαό- λιπος	Ελαιό- λαδο	Φοινικο- πυρηνέλαιο	Κοκό- λιπος	Αραχιδέ- λαιο
8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	7.1	0.1
10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	3.2	7.3	0.1
12:0	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	58.7	54.9	0.6
14:0	0.1	0.1	ίχνη	0.6	ίχνη	ίχνη	0.1	-	21.7	17.4	0.3
15:0	-	ίχνη	-	-	-	-	ίχνη	-	ίχνη	-	-
16:0	11.3	6.0	3.8	23.8	13,8	9,8	28.3	9.9	5.2	6.1	13.3
16:1	0.1	0.1	0.3	0.6	0,5	ίχνη	0.5	0.6	ίχνη	-	0.3
17:0	0.1	ίχνη	ίχνη	-	-	-	0.3	ίχνη	-	-	-
17:1	0.1	ίχνη	-	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-
18:0	4.5	4,3	1.0	3.2	2,8	4.9	34.9	2.6	33.0	1.6	2.1
18:1	24.0	38,3	14.5	17.8	26,2	41.4	30.5	79.0	4.7	5.0	47.8
18:2	51.0	50,9	13.4	53.8	55,2	43.4	3.0	6.2	1.3	1.3	29.2
18:3	7.7	0,3	9.4	-	1,1	0.2	ίχνη	0.7	0.1	-	1.0
20:0	0.5	-	0.9	0.1	0,2	0.2	2.3	0.4	-	-	1.2
20:1	0.3	0.1	9.9	-	-	-	-	-	-	-	-
20:2	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:0	0.3	ίχνη	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	2.9
22:1	-	-	44.7	-	-	-	-	-	-	-	0.1
23:0	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
24:0	-	-	ίχνη	-	-	-	-	-	-	-	1.1
24:1	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 1.2 Αναλογία (%) των λιπαρών οξέων σε ζωικά λίπη

Λιπαρά Οξέα	Χοίρειο λίπος	Βόειο λίπος	Λίπος προβάτου	Λίπος βουτύρου γάλακτος (αγελάδας)
10:0 και μικρότερα	-	-	-	9.9
12:0	0.1	0.1	0.8	3.0
14:0	1.8	4.3	6.7	10.0
14:1	-	1.4	1.2	2.0
15:0	0.3	0.7	0.9	1.4
15:1	-	-	0.6	-
16:0	25.9	27.1	21.0	25.5
16:1	3.4	5.3	3.5	2.0
16:2	-	-	0.8	-
17:0	0.8	1.6	1.6	0.5
17:1	0.4	1.4	1.0	0.5
18:0	14.8	15.7	17.5	15.2
18:1	43.7	38.0	37.2	27.5
18:2	6.3	3.4	3.8	2.5
18:3	1.1	-	2.9	-
20:0	-	0.4	0.5	-
20:1	1.4	-	-	-

(Ταούκης & Ωραιοπούλου, 2019)

1.2 ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ - POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (PUFAS)

Είναι λιπαρά οξέα τα οποία περιέχουν δύο ή και παραπάνω διπλούς δεσμούς στην κεντρική υδρογονανθρακική αλυσίδα. Ταξινομούνται με βάση τη θέση του πρώτου διπλού δεσμού, απαριθμώντας από το άκρο μεθυλίου. Ένα ω-3 PUFA έχει τον πρώτο διπλό δεσμό στη θέση C₃, μετρώντας από το μεθυλικό άκρο, αντίστοιχα ένα ω-6 PUFA έχει τον πρώτο διπλό δεσμό στη θέση C₆ και ούτω καθ' εξής. Οι παραπάνω, εφόσον υπάρχουν,

διπλοί δεσμοί θα εμφανίζονται διαδοχικά ανά τρία άτομα άνθρακα, καθώς δεν είναι ποτέ γειτονικοί, όπως έχει προαναφερθεί. Τα πιο διαδεδομένα PUFAs στη φύση διαθέτουν 18 με 24 άτομα άνθρακα, όπως τα i) εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA, 22:6n-3), ii) εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5n-3), iii) δοκοσαπεντανοϊκό οξύ (DPA, 22 :5 n-3/n-6), iv) αραχιδονικό οξύ (AA; 20:4 n-6), v) γ-λινολενικό(GLA;18:3n-6), vi) α- λινολενικό οξύ (LNA; 18:3 n-3) και vii) λινολεϊκό οξύ (LA; 18:2 n-6).

Πίνακας 1.3 Λιπαρά οξέα που υπάρχουν στη φύση (de Swaaf, 2003)

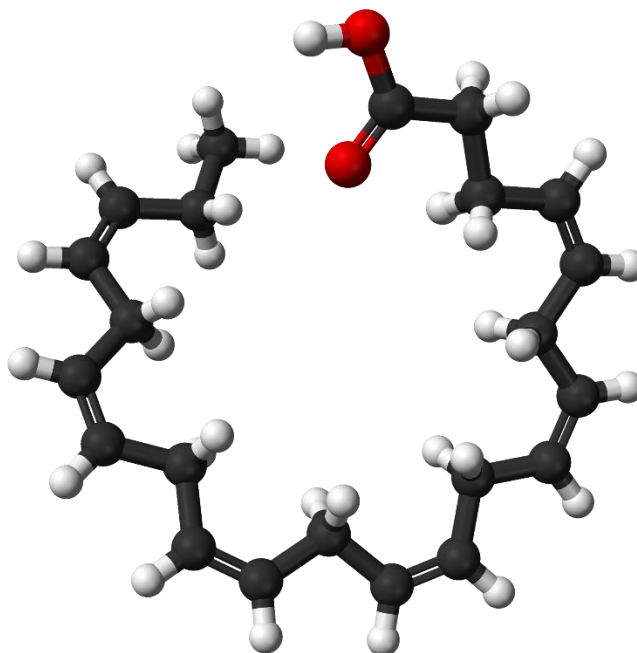
Common name	Systematic name*	Short name
Saturated fatty acids		
Lauric acid	Dodecanoic acid	12:0
Myristic acid	Tetradecanoic acid	14:0
Palmitic acid	Hexadecanoic acid	16:0
Stearic acid	Octadecanoic acid	18:0
Monounsaturated fatty acids		
Palmitoleic acid	Δ9-Hexadecenoic acid	Δ9 16:1
Oleic acid	Δ9-Octadecenoic acid	Δ9 18:1
ω-6 Polyunsaturated fatty acids		
Linoleic acid (LA)	Δ9, Δ12-Octadecadienoic acid	ω-6 18:2
γ-Linolenic acid (GLA)	Δ6, Δ9, Δ12-Octadecatrienoic acid	ω-6 18:3
Arachidonic acid (ARA)	Δ5, Δ8, Δ11, Δ14-Eicosatetraenoic acid	ω-6 20:4
ω-3 Polyunsaturated fatty acids		
α-Linolenic acid (LNA)	Δ9, Δ12, Δ15-Octadecatrienoic acid	ω-3 18:3
Eicosapentaenoic acid (EPA)	Δ5, Δ8, Δ11, Δ14, Δ17-Eicosapentaenoic acid	ω-3 20:5
Docosahexaenoic acid (DHA)	Δ4, Δ7, Δ10, Δ13, Δ16, Δ19-Docosahexaenoic acid	ω-3 22:6

*All double bonds are in *cis*-configuration

Τα λιπαρά οξέα, ως συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, υπάρχουν σε όλες τις μορφές ζωής. Δεδομένου ότι οι κυτταρικές μεμβράνες είναι υπεύθυνες για τη λήψη πληροφοριών αλλά και για την ανταπόκριση σε οτιδήποτε μπορεί να διαταράξει την ενδοκυτταρική οργάνωση, οι μεταβολές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων έχουν άμεσο αντίκτυπο στη κυτταρική λειτουργία. Συνεπώς, ο ρόλος ενός λιπαρού οξέος δεν είναι μόνο δομικός ή ενεργειακός αλλά και λειτουργικός. Τα λιπαρά οξέα εμπλέκονται σε

διάφορες διεργασίες όπως: ο έλεγχος της διαπερατότητας και της πλαστικότητας της μεμβράνης, η κυτταρική διαίρεση, ο σχηματισμός ορμονών και η ανοσολογική απόκριση (Eneka, 2008). Η ρευστότητα της μεμβράνης καθορίζεται ισχυρά από τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες και από την εσωτερική σύσταση του κυττάρου. Το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει τη ρευστότητα της μεμβράνης, όπου δρα ως ευαίσθητος υποδοχέας και επηρεάζει το κυτταρικό κύκλο (Beney και Gervais, 2001). Επιπροσθέτως, η ρευστότητα της μεμβράνης εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, που εμφανίζονται στα φωσφολιπιδικά συστατικά, τα οποία, λόγω της τρισδιάστατης δομής και των λιγοςτών αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου, αυξάνουν την πρωτεϊνική εισχωρή. Για παράδειγμα, ο βαθμός ακορεστότητας των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων του *Escherichia coli* μειώθηκε, ως ανταπόκριση των χαμηλών θερμοκρασιών, προκειμένου να διατηρηθεί το βέλτιστο ιξώδες (Nakayama et al., 1980).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα PUFAs: α) αυξάνουν την ανοχή στις τάσεις που εμφανίζει το κύτταρο β) διευρύνουν τα θερμοκρασιακά όρια επιβίωσης (Peyou-Ndi et al., 2000), γ) βοηθούν στην προσαρμογή σε διαφορετικές αλατότητες, οσμωτικές πιέσεις (Khaware et al., 1995) ή σε συνθήκες κατάψυξης (Giraud et al., 2000). Ειδικότερα, το DHA διαθέτει πολύ ανθεκτική δομή στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της πίεσης που απαντώνται στη μεμβράνη (Rabinovich & Ripatti, 1991) και ρυθμίζει την δομή της αλυσίδας, τη ρευστότητα, τη διαπερατότητα και την πρωτεϊνική δραστηριότητα (Stillwell και Wassall, 2003). Σε πιο αναπτυγμένους και σύνθετους οργανισμούς, το μεμβρανικό DHA διευκολύνει τις γρήγορες μεταμορφωτικές αλλαγές στις πρωτεΐνες της μεμβράνης που σχετίζονται με τις οπτικές και τις νευρομυϊκές διεργασίες (Brown, 1994).



Εικόνα 1.4 Δομή του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA)

(G. Jakobsen, A. Vik, T. V. Hansen, "Tetrahedron Lett." "2012", "53", 5837–5839
Model & image generated in Accelrys DS Visualizer)

Τα PUFAs λειτουργούν ως πρόδρομοι ισχυρών βιοδραστικών μεσολαβητών που εμπλέκονται στην κυτταρική συμπεριφορά και στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων (Kingsella et al., 1990). Αυτά τα μόρια σηματοδότησης έχουν μεγάλη επίδραση στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Calder et al., 2002), την πήξη του αίματος και την ομοιοστάση του κυττάρου (Calder, 2002). Ακόμα, επηρεάζουν τις συναπτικές διαβιβάσεις, την πλαστικότητα, την νευροπροστασία και τη ρύθμιση ύπνου / αφύπνισης (Chen και Bazan, 2005). Τα Διχομο-γ-λινολεϊκό οξύ (DGLA, 20: 3 η-6), ARA και EPA απελευθερώνονται από μεμβρανικά φωσφολιπίδια με τη δράση της φωσφολιπάσης A2 (Kingsella et al., 1990). Ως αποτέλεσμα, το προφίλ των λιπαρών οξέων της φωσφολιπιδικής μεμβράνης, διαμορφώνει τη μεταβολική απόκριση του οργανισμού.

Η διατροφική έλλειψη των λιπαρών οξέων ή η ανισορροπία της σχέσης n-3 / n-6 λιπαρών οξέων μπορεί να προκαλέσει παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την ανοσοκαταστολή (ή ανοσολογική ανεπάρκεια), όπως: αυτοάνοσα νοσήματα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Crohn, καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη, στεφανιαία νόσο, εγκεφαλικό επεισόδιο, αμφιβληστροειδική και

εγκεφαλική υπανάπτυξη στην παιδική ηλικία (Connor, 2000), καθώς και νευρολογικές διαταραχές όπως η επιληψία και η νόσος του Alzheimer (Chen & Bazan, 2005). Επίσης, τα ουδέτερα λιπίδια είναι η πιο αποτελεσματική και τελεσφόρα βιολογική μορφή αποθήκευσης άνθρακα και ενέργειας. Είναι υδρόφοβα μόρια που επιτρέπουν το σχηματισμό μικυλλίων εντός του νερού, παρέχοντας μια συμπαγή μορφή αποθηκευμένης ενέργειας, έτοιμη να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο κατά τη διάρκεια ασιτίας. Ως εκ τούτου, σε πολλούς οργανισμούς όπως σπόροι φυτών, ελαιώδεις μικροοργανισμοί ή ορισμένα ψάρια, μεταξύ άλλων, γλυκερολιπίδια αποθηκεύονται ως πηγή ενέργειας πριν την αναπαραγωγή ή την εμφάνιση δυσμενών συνθηκών περιβάλλοντος, ως προετοιμασία (Eneka, 2008). Κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στα γλυκερολιπίδια, που περιέχουν μέχρι και 20 μόρια άνθρακα στην αλειφατική αλυσίδα, οξειδώνονται εύκολα στα μιτοχόνδρια για να παραχθεί μεταβολική ενέργεια. Αντίθετα, το DHA αποτελεί ένα φτωχό μιτοχονδριακό υποστρώμα και απαιτεί υπεροξειδωτική β-οξείδωση (Madsen et al., 1999).

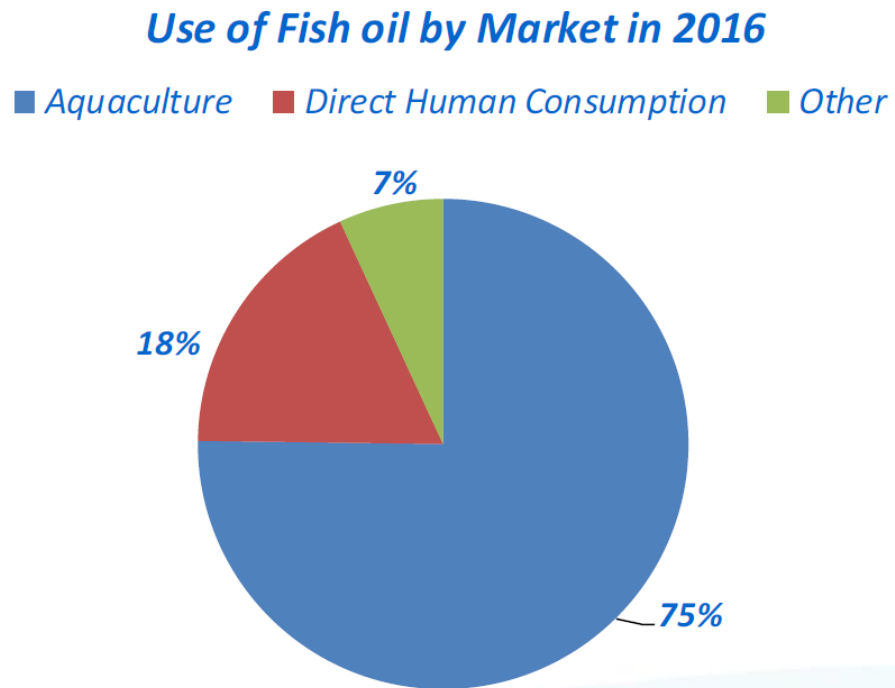
1.2.1 Σημασία PUFAs στα ψάρια και τις υδατοκαλλιέργειες

Η σημασία των PUFAs για την υγιή ανάπτυξη των ψαριών είναι γνωστή και έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια. Αυτό οδηγεί στην εκτεταμένη χρήση των PUFAs από τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, ο οποίος κατέλαβε το 75% της παγκόσμιας αγοράς ιχθυελαίου το 2016 (Εικόνα 1.5). Το συνολικά παραγόμενο παγκόσμια ιχθυέλαιο το 2016 έφθασε τους 905 εκατομμύρια τόνους, ενώ το 2018 ξεπέρασε το 1 δισεκατομμύριο. Κυριότεροι παραγωγοί είναι το Περού, οι σκανδιναβικές χώρες, η Χιλή, οι Η.Π.Α. και η Κίνα, ΛΔ (Εικόνα 1.6).

The aquaculture sector continues to be the main consumer of fish oil, taking now an estimated 75% of the total fish oil consumed worldwide.

This has clearly been possible by a reduction in the market share of the pharmaceuticals, which moved from 21% to 18%.

However, back in 2016 86% of the fish oil was consumed in aquaculture and just 8% for direct human consumption.

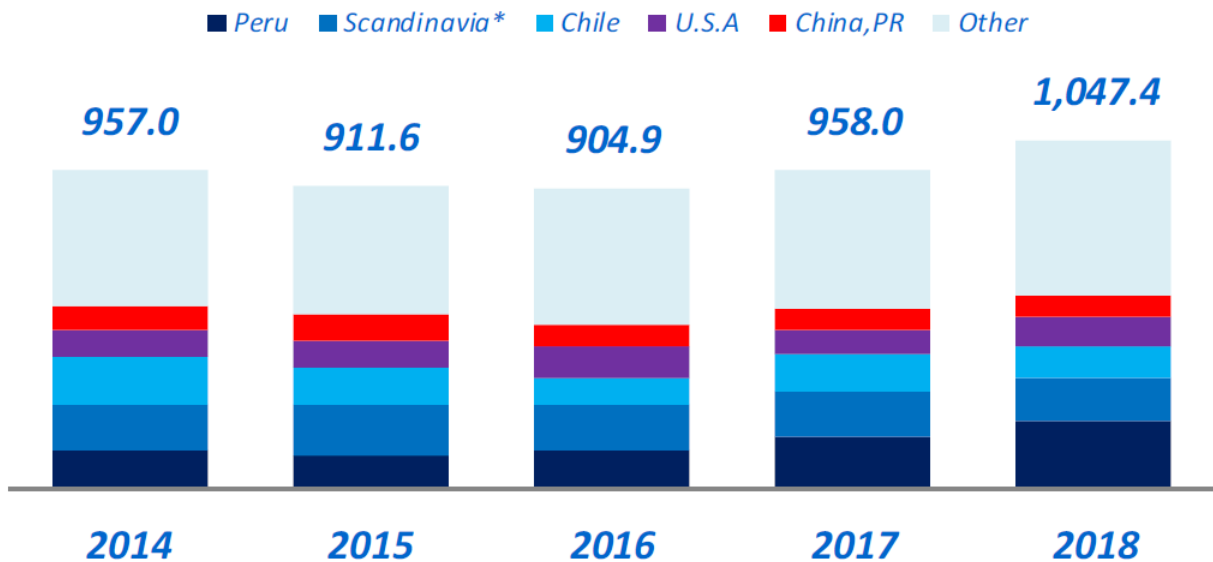


Εικόνα 1.5 Απορρόφηση ιχθυελαίου από την αγορά για το 2016
(Dr Enrico Bachis, 57thIFFO Annual Conference, Washington)

Οι πρώτες προσπάθειες καλλιέργειας ψαριών με τροχοφόρα (τροχόζωα), ανέφεραν υψηλά επίπεδα θνησιμότητας των προνυμφών όταν τα PUFAs απουσίαζαν από τη δίαιτα (Watanabe et al., 1983). Στις προνύμφες ψαριών, οι απαιτήσεις για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πιο εμφανείς επειδή κατά τη διάρκεια των σταδίων ταχείας ανάπτυξης, το σώμα δεν μπορεί να συνθέσει όλα τα απαραίτητα συστατικά με τον απαιτούμενο ρυθμό. Ως εκ τούτου, μόλις εξαντληθούν από την προνύμφη τα θρεπτικά του λεκιθικού σάκου, οι ελλείψεις των PUFA οδηγούν σε υψηλή θνησιμότητα, χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και μειωμένη δραστηριότητα (Izquierdo, 1996, 2005). Είναι γενικά κατανοητό, ότι τα αυγά συμβάλλουν με όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των εμβρύων και των προνυμφών πριν από το έναυσμα της εξωτερικής σίτισης. Λόγω της ανθεκτικότητας στη διαιτητική τροποποίηση της λιπιδικής σύνθεσης των αυγών σε

σχέση με άλλους ιστούς, συνάγεται ότι αυτό μπορεί να ικανοποιεί τις απαιτήσεις σε PUFAs για τα ακόλουθα πρώιμα στάδια ζωής του είδους. Πράγματι, τα αυγά των θαλάσσιων ψαριών (Sargent et al., 2003), συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.- Σπάρος ο χρυσόχρους) (Mourente και Odriozola, 1990), περιέχουν υψηλές ποσότητες PUFAs και φωσφολιπιδίων. Περαιτέρω, τα υποσιτισμένα νεογνά ψάρια έχουν την τάση να διατηρούν τα πολύτιμα n-3 PUFA των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων συγκριτικά με άλλα λιπαρά οξέα του σώματος (Koven et al., 1989).

Fish oil world production ('000 mt)



Εικόνα 1.6 Παγκόσμια παραγωγή ιχθυελαίου για το 2016

(Dr Enrico Bachis, 57th IFFO Annual Conference, Washington)

Οι πρώτες επιτυχείς προσπάθειες καλλιέργειας θαλάσσιων προνυμφών χρησιμοποίησαν n-3 PUFAs από ιχθυέλαια (γαλακτωματοποιημένα με λεκιθίνη) ως διατροφικός εμπλουτισμός (Watanabe et al., 1983). Τα DHA, το EPA και το ARA είναι απαραίτητα λιπαρά οξέα για την κανονική ανάπτυξη, εξέλιξη (Watanabe, 1982) και αναπαραγωγή (Izquierdo et al., 2001) των ψαριών. Οι προνύμφες θαλάσσιων ψαριών φαίνεται να έχουν υψηλότερες ειδικές απαιτήσεις για το DHA απ' ό τι τα μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια. Το DHA ενσωματώνεται στους αναπτυσσόμενους οπτικούς και νευρικούς ιστούς (Mourente, 2003), οι οποίοι, σε αυτό το στάδιο καταλαμβάνουν μεγαλύτερο ποσοστό σωματικού βάρους σε σχέση με άλλα πλήρως ανεπτυγμένα ψάρια.

Η έλλειψη του DHA από τη διατροφή, σχετίζεται με την: α) εξασθενημένη ικανότητα σύλληψης θηράματος των προνυμφών της ρέγγας (*Clupea harengus* L.), υπό φυσικές εντάσεις φωτός (Bell et al., 1995), β) καθυστερημένη ανάπτυξη του ιαπωνικού μαγιάτικου (yellowtail - Japanese amberjack - *seriola quinqueradiata*) (Masuda et al., 1998) και της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.- Σπάρος ο χρυσόχρους) ((Benitez-Santana et al., 2006), γ) αυξημένη εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών (Cahu et al., 2003) και δ) ανοσοκαταστολή ή αλλιώς, ανοσολογική ανεπάρκεια (Montero et al., 2004). Το DHA και EPA ενσωματώνονται ανταγωνιστικά στις κυτταρικές μεμβράνες, ωστόσο, το πρώτο εμφανίζεται ως υπέρτερο βασικό λιπαρό οξύ για τα περισσότερα είδη (όπως για παράδειγμα στο φαγκρί (*Pagrus major*, Red seabream)), για την ανάπτυξη και τις αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης (Watanabe et al., 1983, 1989, Taverna, 2008).

1.2.2 Σημασία των PUFAs στον άνθρωπο

Τα PUFAs C₁₈ λινολενικό (LA, 18: 2 n-6) και α-λινολενικό οξύ (ALA, 18: 3 n-3), θεωρούνται ως απαραίτητα διατροφικά λιπαρά οξέα στα περισσότερα επίγεια σπονδυλωτά (Castro, 2016). Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι πρόδρομοι μιας ποικιλίας πολύ σημαντικών PUFAs, αλλά δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* στους ανθρώπους. Συνήθως, τα συγκεκριμένα λιπαρά βρίσκονται σε επαρκείς ποσότητες στις διατροφικές

συνήθειες που ακολουθούν οι άνθρωποι που ζουν στις βιομηχανικές χώρες, επειδή είναι παρόντα στα περισσότερα ανώτερα φυτά. Ωστόσο, η σύνθεση των PUFAs μέσω μιας σειράς επιμηκύνσεων και σχηματισμών διπλών δεσμών στους ιστούς φαίνεται να εμφανίζεται με ανεπαρκή ρυθμό σε ορισμένα στάδια της ζωής (Burdge και Wootton, 2002; Emken et al., 1994; Gerster, 1998; James et al., 2003;

Nakamura & Nara, 2003). Οι συνθέσεις των PUFAs εξαρτώνται από την ηλικία, το φύλο, τη διατροφή, την παρουσία ασθενειών και τις μεταβολικές διεργασίες. Ως εκ τούτου, τα LA και ALA που προσλαμβάνονται από τη διατροφή, δεν αρκούν για να καλύψουν πλήρως τις ανάγκες σε PUFAs.

Διατροφή υπολειπόμενη σε PUFAs θα μπορούσε να προκαλέσει μια ευρεία ποικιλία προβλημάτων υγείας σε μακροπρόθεσμο διάστημα (Bistrian, 2003). Αντίθετα, διατροφικά PUFA που μπορούν να ρετρο – μετατραπούν μερικώς σε λιπαρά οξέα μικρότερης αλυσίδας, αντιστρέφουν τα αρνητικά συμπτώματα που εμφανίζονται λόγω ελλιπής παρουσίας των LA και ALA (Hansen et al., 1986, Sprecher et al., 1995). Με βάση αυτά τα ευρήματα, τα DHA, EPA και ARA θεωρούνται και αυτά ως απαραίτητα λιπαρά οξέα για τη διατήρηση των υγιών λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος (Cunhane, 2000). Πολλά διαφορετικά οφέλη για την υγεία έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με τα n-3



Εικόνα 1.7 Κάψουλες πλούσιες σε ωμέγα-3 λιπαρά (FOA, Globefish Highlights, April 2019)

PUFA (Simopoulos, 1999). Υπάρχουν αξιοσημείωτα στοιχεία που υποδεικνύουν τα θετικά αποτελέσματα που προκαλεί η διατροφική λήψη n-3 PUFA, όπως η πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (Lichtenstein, 2003), αθηροσκλήρωσης (Ristic & Ristic, 2003), ορμονο-εξαρτώμενων καρκίνων (Terry et al., 2003), διαβήτη (Brenner, 2003) αλλά και στη παρεμπόδιση εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η ρευματική αρθρίτιδα (Cleland et al., 2003, Simopoulos, 2002). Συγκεκριμένα, το DHA εμπλέκεται στην: προστασία των νευρολογικών ιστών από το οξειδωτικό στρες (Yavin et al., 2002), ανάπτυξη του εγκεφάλου (Wainwright, 2002) και του αμφιβληστροειδή (Jeffrey et al., 2001), πρόληψη της διπολικής ψυχικής διαταραχής (Burgess et al., 2000), σχιζοφρένειας (Kemperman et al., 2006), κατάθλιψης (Sontrop & Campbell, 2006) και της νόσου Alzheimer (Cole et al., 2005).

Αν και τα επίπεδα διατροφικών PUFA εξαρτώνται από τις διατροφικές συνήθειες των διαφόρων κοινωνικών ομάδων και περιοχών, η ελάχιστη συνιστώμενη πρόσληψη περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο πλούσια σε ιχθυέλαιο ψάρια εβδομαδιαίως, και συγκεκριμένα την προσθήκη των DHA και ARA σε όλες τις βρεφικές τροφές ανεξάρτητα από την πρόσληψη των LA και ALA (FAO / ΠΟΥ, 1994). Η διατροφική πρόσληψη του n-6 LA από φυτικά έλαια στις δυτικές χώρες είναι πολύ πιο άφθονη από την αντίστοιχη του n-3 ALA (Kris-Etherton et al., 2000; Nettleton, 1991; Sanders, 2000). Ελλείπει διατροφικής πηγής PUFA, η ανισορροπία του λόγου n-3 / n-6 στο σώμα διατηρείται, ή και αυξάνει. Δεδομένου ότι και οι δύο n-οικογένειες είναι πρόδρομοι των εικοσανοειδών, η αναλογία τους (n-3 / n-6) πρέπει να εξισορροπηθεί μέσω της διατροφής για να διασφαλιστεί η σωστή λειτουργία του μεταβολισμού. Με την προϋπόθεση ότι η πρόσληψη των n-6 λιπαρών είναι σήμερα υψηλή στις δυτικές κοινωνίες (ο λόγος του κλάσματος <1), η ισορροπία n-3 / n-6 πρέπει να διορθωθεί με την πρόσληψη n-3 λιπαρών (DHA και EPA) μέσω της διατροφής σε ποσότητες της τάξεως του 0,5 g d⁻¹ για βρέφη, 1g d⁻¹ για ενήλικες και 2-4 g d⁻¹ για ασθενείς υπεργλυκαιμίας ή υψηλού κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων (Kris-Etherton et al., 2002).

Επί του παρόντος, τα ψάρια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παράγονται από την υδατοκαλλιέργεια και την ιχθυοκαλλιέργεια, αποτελούν την κύρια πηγή n-3 PUFA στη διατροφή (Eneka, 2008).

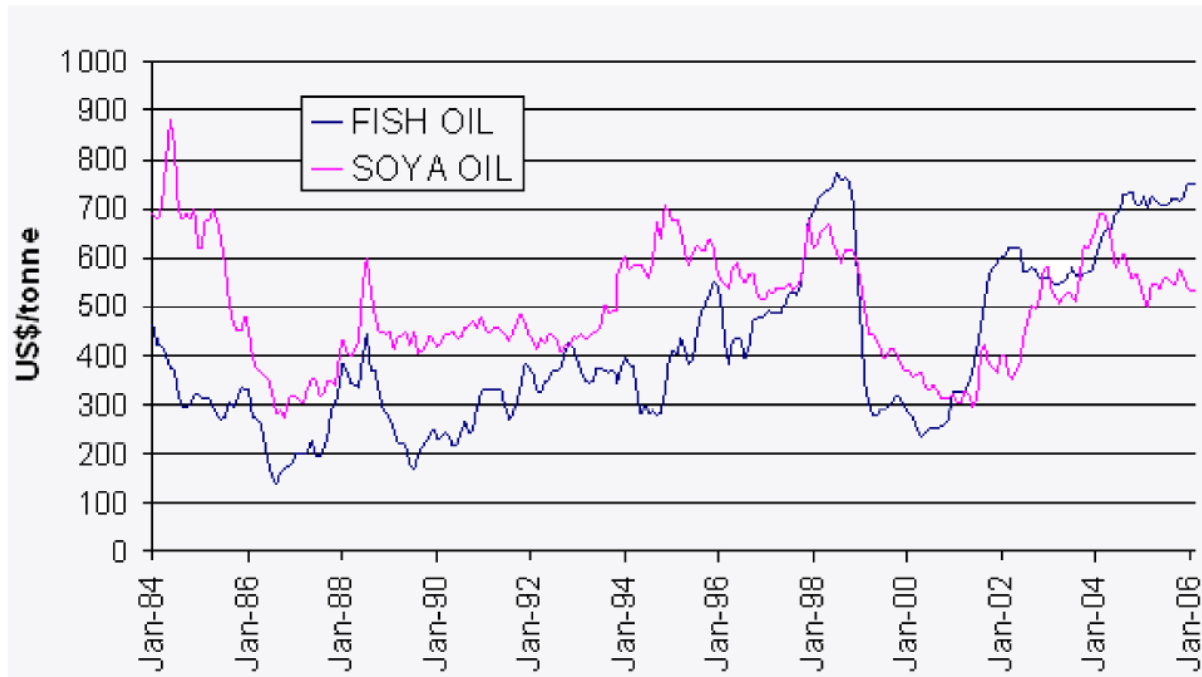
1.3 ΠΗΓΕΣ PUFAS

1.3.1 Ιχθυέλαιο

Σήμερα, τα φυτικά έλαια, τα οποία είναι πλούσια σε n-λιπαρά οξέα, απαρτίζουν την πλειοψηφία των φυσικών βρώσιμων ελαίων στην παγκόσμια αγορά (O'Mara, 1998). Τα ζωικά λιπίδια, όπως το λαρδί, είναι φθηνότερα αλλά δεν θεωρούνται όσο υγιεινά και θρεπτικά είναι τα φυτικά έλαια, εξαιτίας της έλλειψης PUFAs και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κορεσμένα λιπαρά. Τα ψάρια αποτελούν την κύρια πηγή των n-3 PUFAs, ιδιαίτερα του DHA και του EPA (Nettleton, 1991). Παραδοσιακές πηγές PUFAs ως πρώτη ύλη, αποτελούν το ιχθυέλαιο και τα ιχθυάλευρα που παράγονται κυρίως από μικρά λιπαρά ψάρια όπως ο γαύρος (οικογένεια Engraulidae), ο καπελάνος (*Mallotus villosus*) και το προσφυγάκι (*Micromesistius routassou*) που είναι οστεώδη και λιγότερο κατάλληλα για βρώση από τον άνθρωπο.

Το ιχθυέλαιο περιέχει ένα σύνθετο και ποικίλο προφίλ λιπαρών οξέων. Η ποιότητά του εξαρτάται από τα είδη των ψαριών, την εποχή, την τοποθεσία αλιείας και την μετέπειτα επεξεργασία και απομόνωση. Τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα στο ιχθυέλαιο είναι το DHA και EPA, με συνιστώμενη αναλογία DHA/ EPA 0.5 προς 2 (National Research Council (NRC), 2011) Το σογιέλαιο αποτελεί πιθανώς την κύρια εναλλακτική λύση για το ιχθυέλαιο στην αγορά (με τιμή χαμηλότερη κατά 40%), αλλά όπως και άλλες φυτικές πηγές, στερείται PUFAs.

Το Περού που αποτελεί τον κύριο παραγωγό ιχθυελαίου επηρεάζεται έντονα από τα κλιματικά φαινόμενα. Αυτό σημαίνει ότι, η μειωμένη αλιεία στις ακτές του Περού επηρεάζει την τιμή του ιχθυελαίου σε παγκόσμιο επίπεδο. Συγκεκριμένα, η παγκόσμια τιμή του ιχθυελαίου και των ιχθυαλεύρων το 1998 αυξήθηκε σε 750 αμερικάνικα δολάρια ανά τόνο ($\$ \text{ton}^{-1}$) λόγω ενός ισχυρού φαινομένου " El Niño " (η θερμή φάση του φαινομένου El Niño–Southern Oscillation, ENSO) (Εικόνα 1.8). Τη δεκαετία του 1990 και 2000 η ετήσια παγκόσμια παραγωγή του ιχθυελαίου και του ιχθυάλευρου παρέμεινε σταθερή (1,0-1,7 και 6,2-7,4 εκατομμύρια τόνους αντιστοίχως), αλλά η τιμή αυξήθηκε προοδευτικά λόγω της αυξανόμενης ζήτησης.

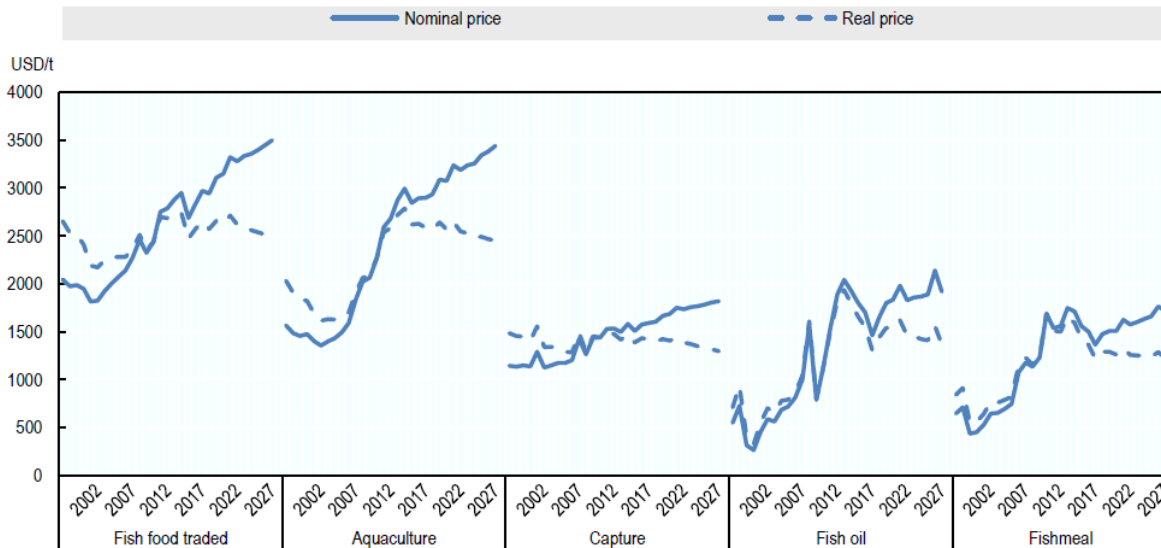


Εικόνα 1.8 Τιμές ιχθυελαίου και σογιέλαιου για την περίοδο 1984-2006 (Josupeit, 2006)

Στις αρχές του 2006 η τιμή του ψαριού έφθασε πάλι τα 750 αμερικανικά δολάρια. Έτσι, το ιστορικό μέγιστο που επιτεύχθηκε το 1998 λόγω του φαινομένου "El Niño" ξεπεράστηκε λόγω της αυξανόμενης ζήτησης του προϊόντος. Ο παγκόσμιος οργανισμός ιχθυάλευρου και ιχθυέλαιου (International Fishmeal & Fish Oil Organization (IFFO)), ανέφερε μεταξύ άλλων ότι τα αλιεύματα δεν αναμένεται να αυξηθούν αναλογικά με τη ζήτηση (Shepherd et al., 2005).

Η υδατοκαλλιέργεια, το χοιρινό κρέας, τα πουλερικά και τα μηρυκαστικά είναι οι κύριοι τομείς επιρροής στην παγκόσμια παραγωγή ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρων. Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί το βασικό πυλώνα στην αγορά του ιχθυελαίου και είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας τροφίμων, που καλύπτει το ένα τρίτο του συνόλου των ψαριών που καταναλώνονται από τους ανθρώπους (Eneka, 2008). Η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας αναμένεται να αυξάνεται με ετήσιο ρυθμό 4,5% για την περίοδο 2010-2030 (Brughere and Ridler, 2004). Ως εκ τούτου, είναι ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην αυξανόμενη ζήτηση ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρων (Naylor et al., 2000; Tacou, 2004). Για να υπερκαλυφθεί η ζήτηση της αγοράς, μειώθηκε η χρήση των

ιχθυελαίων στον τομέα της κτηνοτροφίας και της παραγωγής μαργαρίνης, ενώ αυξήθηκε στις υδατοκαλλιέργειες και στις τροφές καρκινοειδών. Βεβαίως, το βασικό στοιχείο που προκαλεί αυτή την αναδιοργάνωση της χρήσης ιχθυελαίου, είναι η θρεπτική αξία των η-3 λιπαρών οξέων.



Εικόνα 1.9 Τιμές παγκόσμιας αγοράς ιχθύων

CD/FAO (2018), “OECD-FAO Agricultural Outlook”, OECD Agriculture statistics (database), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>.

Έχουν γίνει πολλές έρευνες για να βρεθεί βιώσιμος τρόπος αύξησης της αναπτυσσόμενης υδατοκαλλιέργειας (Naylor et al., 2000). Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις που μπορούν να προλάβουν την έλλειψη του ιχθυελαίου, προκειμένου να διαφυλαχθεί η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας (Sargent et al., 1999). Πρώτον, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η μετατόπιση της χρήσης ιχθυελαίου, που βρίσκεται σε εξέλιξη. Εκτροπή της διάθεσης ιχθυελαίου από τα χερσαία ζώα στα θαλάσσια είδη και ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια ταχείας ανάπτυξης που τα διέπουν υψηλότερες απαιτήσεις για PUFAs. Ασφαλώς, απαιτείται λύση η οποία μπορεί να έχει επίδραση σε βραχυπρόθεσμο ή μακροπρόθεσμο στάδιο, στην ανάπτυξη και καλλιέργεια των χερσαίων θηλαστικών, αν μειωθούν ή αποκοπούν τελείως τα PUFAs από τις διατροφικές τους συνήθειες. Δεύτερον, βελτιστοποίηση της επεξεργασίας και μεταποίησης των πρώτων υλών, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η απόδοση σε PUFAs, δεδομένου ότι, αποτελούν τα κύρια θρεπτικά

συστατικά του ιχθυελαίου. Τρίτον, μερική αντικατάσταση των πηγών λιπιδίων διατροφικής χρήσης, με πηγές φυτικών ελαίων. Ο βαθμός υποκατάστασης από πηγές φυτικών ελαίων, επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των ψαριών, την ευημερία και την ποιότητα των προϊόντων του καταναλωτή σε ορισμένα σαρκοφάγα ψάρια. Εντός συγκεκριμένων ορίων και συνθηκών, επιτεύχθηκαν αντίστοιχα προφίλ λιπαρών οξέων με αυτά των συμβατικών πηγών (Izquierdo et al., 2003, 2005 · Bell et al., 2005, Ganga et al., 2005). Ωστόσο, παρά τις ενέργειες αυτές που αποσκοπούν στην αποτροπή και πρόληψη της έλλειψης ιχθυελαίου, η οριστική βιώσιμη λύση αυτού του προβλήματος βασίζεται στην παραγωγή και ανάπτυξη εναλλακτικών πηγών PUFA (Eneka, 2008).

1.3.2 Έλαια μονοκύτταρων οργανισμών

Τα μονοκυτταρικά ή μικροβιακά έλαια – Single Cell Oils (SCO), εξάγονται εμπορικά από μονοκύτταρους οργανισμούς (Ratledge, 1992). Το μικροβιακό έλαιο, μια σχετικά νέα έννοια στον τομέα της βιοτεχνολογίας, αποκτά σταδιακά μεγαλύτερη προσοχή και σημασία λόγω της ικανότητάς να παραχθούν PUFAs σε μεγάλη κλίμακα. Αν και σήμερα, η μαζική πηγή PUFAs, σε όρους ποσότητας - χαμηλής τιμής είναι το ιχθυέλαιο, τα SCO παρουσιάζονται ως δυνητικός υποκαταστάτης, καθώς εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές πηγές.

Το ιχθυέλαιο αναφέρεται σε ένα πολύπλοκο μείγμα, με περισσότερα από 40 διαφορετικά λιπαρά οξέα, η αναλογία των οποίων ποικίλλει ανάλογα με τα είδη και τη σεζόν, ενώ οι μικροβιακές πηγές θα μπορούσαν να παρέχουν, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, πιο συγκεντρωμένες πηγές συγκεκριμένου λιπαρού οξέος, με σταθερό ρυθμό. Επίσης, η απομόνωση συγκεκριμένου λιπαρού οξέος καθίσταται ευκολότερη και οικονομικότερη, λόγω της μικρής παρουσίας άλλων PUFAs. Ορισμένα ιχθυέλαια, παρουσιάζουν υψηλές ποσότητες συγκεκριμένου λιπαρού οξέος, όπως για παράδειγμα, το έλαιο τόνου που είναι πλούσιο σε DHA (Saito et al., 1997), αλλά συνάμα πιο σπάνιο και δαπανηρό. Επιπλέον, υπάρχει ο κίνδυνος τα ιχθυέλαια να αποτελούν αρωγούς θαλάσσιων ρύπων που ενδεχομένως να συσσωρεύονται σε υδατοκαλλιεργημένους οργανισμούς (Hites κ.ά., 2004).

Πίνακας 1.4 Κύρια λιπαρά οξέα διαφόρων μικροοργανισμών και οι αντίστοιχες παραγωγικότητες

Organisms	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 n-6	20:4 n-6	20:5 n-3	22:5 n-6	22:6 n-3	r_{FA} (mg FA $l^{-1} h^{-1}$)
<i>Schizochytrium</i> SR21 ^a	13	29	12	1	1	1	-	-	-	12	36	145 ^b
<i>Schizochytrium</i> ATCC20888 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25-40	≈417
<i>Thraustochytrium aureum</i> ^d	3	8	-	-	16	2	-	3	-	-	52	3
<i>Ulkenia sp.</i> ^a	3	30	-	1	-	1	-	-	-	11	46	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ^a	20	18	2	-	15	0.4	-	-	-	-	39	53 ^e
<i>Nitzschia laevis</i> ^f	23	33	-	-	33	2	1	1	4	-	-	10.4
<i>Mortierella alpina</i> 1S4 ^a	0.2	6	-	2	4	4	2	70	-	-	-	54 ^g
<i>Mucor circinelloides</i> ^h	22	-	1	6	40	11	18	-	-	-	-	4.8 ⁱ

^a (Ratledge, 2004), ^b(Yaguchi *et al.*, 1997), ^c(Barclay *et al.*, 2003), ^d(Singh *et al.*, 1996), ^e(de Swaaf *et al.*, 2003), ^f(Barclay *et al.*, 1994; Kyle and Gladue, 1993), ^g(Higashiyama *et al.*, 1998), ^h(Ratledge and Wynn, 2002), ⁱ(Kennedy *et al.*, 1993)

Αντίθετα, τα ελαιώδη μικρόβια καλλιεργούνται κάτω από προκαθορισμένες επιθυμητές συνθήκες (καλλιέργειες σε σύστημα ανακινούμενων φιαλών είτε σε βιοαντιδραστήρες) που παρέχουν ένα προϊόν υψηλής ποιότητας βιολογικής διατροφής, χωρίς προσμειξεις. Επιπροσθέτως, η εφαρμογή του ιχθυελαίου σε τρόφιμα περιορίζεται λόγω προβλημάτων σταθερότητας, αλλά και της χαρακτηριστικής γεύσης και οσμής που το διακατέχει. Αντίθετα, τα SCO μπορεί να έχουν υψηλότερη οξειδωτική σταθερότητα λόγω των φυσικών αντιοξειδωτικών που συντίθενται εντός του κυττάρου (Sargent *et al.*, 1997) και στερούνται αυτής της δυσάρεστης γεύσης και οσμής.

Τα SCO παράγονται από ελαιώδεις μικροοργανισμούς, που είναι ικανοί να παράγουν λιπαρά οξέα σε ποσότητες που δικαιολογούν εμπορική δραστηριότητα. Συνήθως, αυτή η τιμή καθορίζεται de facto να είναι 20% υψηλότερη του ξηρού βάρους των κυττάρων – cell dry weight (CDW) (Ratledge & Wynn, 2002), όπου θα περιλαμβάνεται αναγκαστικά ένα ποσοστό λιπιδίων αποθήκευσης, χωρίς να είναι ουσιώδη. Αυτά τα λιπίδια αποθήκευσης γενικά συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο ως τριγλυκερίδια, σε σταγονίδια λιπιδίων. Μόνο μερικοί μικροοργανισμοί (ζύμη, μύκητες και

φύκη) είναι ικανοί να συσσωρεύουν λιπίδια ποσοστιαίου βάρους μεταξύ 20-80% CDW (ανάλογα με τα μικροβιακά είδη και τις περιβαλλοντικές συνθήκες).

1.3.3 Μικροοργανισμοί

Οι μονοκύτταροι ετερότροφοι οργανισμοί, αποτελούν καλή πηγή PUFAs, που μπορούν εύκολα να συνδυαστούν με διατροφές, σαν υλικό εμπλουτισμού ή να εφαρμοστούν άμεσα σε μικροσωματιδιακές δίαιτες. Μέχρι στιγμής, οι περισσότεροι μονοκύτταροι ετερότροφοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται προς παραγωγή PUFAs για την ιχθυοκαλλιέργεια ψαριών. Οι προνύμφες των ψαριών απαιτούν υψηλά επίπεδα PUFAs, με κύρια απαίτηση το DHA. Ο λόγος DHA: EPA των περισσότερων εμπορικά διαθέσιμων ιχθυελαίων είναι περίπου 10:20 (Jin, 2015). Ως εκ τούτου, απαιτείται εμπλουτισμός DHA για να υπάρχει η σωστή αναλογία DHA:EPA (0.5 – 2) , η οποία μπορεί να έχει επίδραση στην ανάπτυξη (NRC, 2011).

Τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού αναφέρουν ότι εκτελούνται σε συνθήκες υψηλής αερισμού για 12-24 ώρες, όπου τα γαλακτώματα του ιχθυέλαιου είναι ευαίσθητα στην υπεροξειδωση (McEnoy et al., 1995). Το DHA που βρίσκεται στο γαλάκτωμα εμπλουτισμού είναι δυνατόν να ρετρο-μετατραπεί σε EPA (Izquierdo, 1988; Enjemo et al., 2001), εξαίρεση αποτελεί η γαρίδα *Artemia*, στην οποία δεν έχει ανιχνευθεί ποσότητα DHA (Navarro et al., 1993). Κατά συνέπεια, ο αρχικός λόγος DHA:EPA του εμπλουτισμού πρέπει να είναι πολύ υψηλός για να διατηρηθεί η διατροφική αξία. Αυτή η αναλογία δεν παρέχεται από το κοινό ιχθυέλαιο. Εναλλακτικά, τα θαλάσσια μικροφύκη *Schizochytrium sp.* και ο *C. cohnii* είναι καλές πηγές DHA. Τα παρασκευάσματα αποξηραμένων κυττάρων αυτών των οργανισμών μπορούν να χορηγηθούν απευθείας ως τροφή, παρέχοντας μία φυσική πηγή λιπιδίων που περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, μια ποσότητα πολικών λιπιδίων καθώς και πρωτεΐνες και μικροθρεπτικά συστατικά. Εφόσον το EPA συνιστά ποσοστό μικρότερο από 2% των συνολικών λιπαρών οξέων (TFA) σε αυτούς τους μικροοργανισμούς, θα μπορούσαν να παρέχουν DHA, χωρίς την προσθήκη EPA, για να διατηρηθεί η απαιτούμενη αναλογία DHA: EPA κατά την περίοδο του εμπλουτισμού.

Η βιομάζα που προέρχεται από τους μικροετερότροφους οργανισμούς και είναι πλούσια σε PUFAs, εφαρμόστηκε επιτυχώς ως εμπλουτισμός ζωντανής λείας- για τον Ατλαντικό μπακαλιάρο - Γάδο (*Gadus morhua*) (Cutts et al., 2006; Park et al., 2006), εγκλεφίνο (*Melanogrammus aeglefinus*) (Blair et al., 2003), cobia (*Rachycentron canadum*) (Faulk & Holt, 2005), *Latris lineata* (Batanglene et al., 2006), πλευρονήκτη με κίτρινη ουρά (*Limferruginea*) (Copeman et al., 2002), χάλιμπατ Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*) (Shields & Irwin, 1998), ριγωτή πέρκα (*Morone saxatilis*), λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρα (Harel et al. 2002; Koven et al., 2001). Ο συνδυασμός του μικροφύκου *Schizochytrium sp.* ή *C. cohnii* με την γαρίδα *Artemia* (Ritar et al., 2004) και το τροχοζώο *rotifers* (*Brachionus plicatilis*) (Park et al., 2006) αύξησε το περιεχόμενο DHA στον απαιτούμενο λόγο DHA: EPA. Η ζωντανή λεία, και ειδικά η *Artemia*, ρετρο-μετατρέπει το DHA σε EPA, επομένως, a priori, δεν υπάρχει λόγος να εφαρμοστούν νέες προσθήκες μικροβιακών EPA, οι οποίες μπορούσαν να αλλοιώσουν την αναλογία. Οι προνύμφες ψαριών αναπτύσσονται γενικά καλύτερα όταν υπάρξει εμπλουτισμός μικροβιακών πηγών DHA λόγω των υψηλών αναλογιών DHA: EPA που επιτυγχάνονται στη ζωντανή λεία, σε σύγκριση με άλλους εμπορικούς εμπλουτισμούς (Batanglene et al., 2006, Cutts et al., 2006; Harel et al., 2002). Αν και τα βιομηχανικά εκκολαπτήρια ιχθύων εξακολουθούν να βασίζονται σε ζωοτροφές ζωντανής λείας, οι μικροσωματιδιακές δίαιτες μπορούν να παρέχουν τροφή με καλύτερα ελεγχόμενη διατροφική ποιότητα, καθιστώντας πιο εύκολη την πρόβλεψη παραγωγής του γόνου. Βιομάζα του μικροφύκου *C. cohnii* αντικατέστησε το 2-4% του ξηρού βάρους διατροφικού ιχθυελαίου, σε καλλιέργεια τσιπούρας, οδηγώντας σε καλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και επιβίωσης (Atalah et al., 2015)

1.3.4 Μικροοργανισμοί ως πηγή DHA

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των φυκών και των μυκήτων, φαίνεται να είναι οι κύριοι παραγωγοί PUFA στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή μικροβιακή βιοποικιλότητα των ωκεανών (Sogin et al., 2006) και τα μεγάλα ποσοστά αχαρτογράφητων θαλάσσιων ειδών

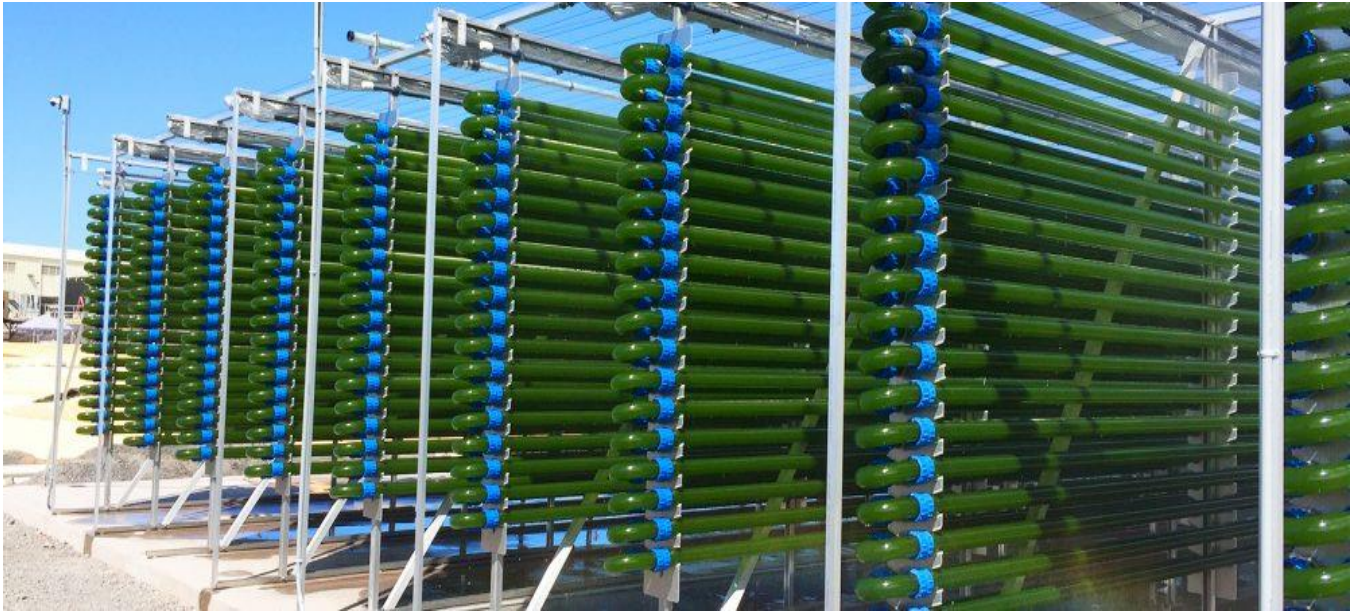
(Colwell, 1997), οι θαλάσσιοι οργανισμοί φέρονται ως δυνητικοί παραγωγοί SCO, εφόσον πραγματοποιηθεί η κατάλληλη έρευνα.

Το DHA είναι προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας με δυνατότητα εκμετάλλευσης μέσω της βιοτεχνολογίας, καθώς δεν μπορεί να παραχθεί φθηνότερα από τα χερσαία φυτά. Τα βακτήρια πιθανότατα δεν είναι κατάλληλα για παραγωγή DHA, πρώτον επειδή δεν συσσωρεύουν μεγάλη ποσότητα τριγλυκεριδίων και δεύτερον επειδή μπορεί να περιέχουν ασυνήθιστα λιπίδια που δεν βρίσκονται τυπικά σε τροφές και τρόφιμα (Ratledge, 2002a) και απαιτείται νέα έρευνα για την οποιαδήποτε επίδραση μπορεί να προκαλέσουν.

Μύκητες καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή πολύτιμων ουσιών, όπως για παράδειγμα οι μύκητες του γένους *Mortierella* καλλιεργούνται για την παραγωγή ARA. Παρ' όλα αυτά οι μύκητες, δεν αποτελούν ενδεδειγμένη λύση για παραγωγή DHA, λόγω των υψηλών χρόνων ζύμωσης, που επακόλουθα οδηγούν σε χαμηλή παραγωγικότητα (Barclay et al., 1994). Υψηλότερη παραγωγικότητα μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ετερογενούς καλλιέργειας μικροφυκών. Τα φύκη, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια ως πηγές DHA, έχουν αποδειχθεί πολύ πιο παραγωγικά όταν μπορούν να αναπτυχθούν σε ετερότροφες και όχι σε φωτοτροφικές συνθήκες (Apt & Behrens, 1999, Zaslavskaja et al., 2001). Η ένταση του φωτός τείνει να μειώνεται γρήγορα εξαιτίας της επίδρασης της σκίασης, η οποία οφείλεται στη συγκέντρωση τόσο των κυττάρων όσο και του προϊόντος ή λόγω του σχηματισμού βιοφίλμ πάνω στην επιφάνεια των βιοαντιδραστήρων (Chen, 2008). Υπάρχει δηλαδή περιορισμός στις μέγιστες κυτταρικές πυκνότητες που μπορούν να επιτευχθούν σε αυτά τα συστήματα. Επιπλέον, αν και η σύντομη διαδρομή του φωτός είναι θεωρητικά ευνοϊκότερη για την επίτευξη υψηλής απόδοσης φωτισμού, οι συμβατικές τεχνητές πηγές φωτός δε μπορούν να βρίσκονται σε στενή επαφή με την καλλιέργεια των μικροφυκών, διότι συνήθως εκλύουν σημαντικά ποσά θερμότητας. Συνεπώς, είναι περιορισμένη η αποδοτικότητα μετατροπής των συμβατικών βιοαντιδραστήρων σε φωτοβιοαντιδραστήρες (Εικόνα 1.10).

Εξαιτίας των προβλημάτων και των περιορισμών που σχετίζονται με τις συμβατικές πηγές φωτός, έχουν αναπτυχθεί διάφορες καινοτόμες στρατηγικές φωτισμού φωτοβιοαντιδραστήρα, με στόχο τη βελτίωση της απόδοσης παραγωγής μικροφυκών και του περιεχομένου τους σε λιπαρά. Με αύξηση του λόγου επιφάνειας προς όγκο

καλλιέργειας, αλλά και με καινοτόμες λύσεις αυξάνεται ελαφρώς η παραγωγικότητα, αλλά υπάρχει περιορισμός εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα. Η καλλιέργεια φυκών σε ανοιχτά συστήματα (θάλασσα, λίμνες, λιμνοθάλασσες) ή σε τεχνητές υδατοσυλλογές ή δεξαμενές, πραγματοποιείται από το 1950. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα τεχνητά συστήματα, είναι οι υδατοδιάδρομοι (raceway ponds) Εικόνα 1.11.



Εικόνα 1.10 Φωτοβιοαντιδραστήρας Phycowalk™, Varicon Aqua

Στις καλλιέργειες ανοιχτού τύπου η μαζική καλλιέργεια γίνεται πιο εύκολα εφικτή, συγκριτικά με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες, οι οποίες απαιτούν υψηλότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας. Το πλεονέκτημα των καλλιέργειών κλειστού τύπου, έγκειται στη δυνατότητα ανεξαρτητοποίησης και απομόνωσης του συστήματος, από εξωτερικούς παράγοντες. Οι αλλαγές στο περιβάλλον (θερμοκρασία, μεταβλητή έκθεση στον ήλιο, ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις), αλλά και επιμολύνσεις από άλλους μικροοργανισμούς, μπορεί να επιβούν επιζήμιες για την ποιότητα του τελικού προϊόντος, αλλά και για τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας. Ειδικότερα, προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση (βρώση, πόση), μπορεί να είναι επικίνδυνα για την υγεία του καταναλωτή.

Επίσης, στις καλλιέργειες ανοικτού τύπου τα φαινόμενα εξάτμισης που παρατηρούνται στο θρεπτικό μέσο, αυξάνουν τη συγκέντρωση των κυττάρων, των μεταβολιτών και των παραπροϊόντων, όπως για παράδειγμα, το μικροφύκος *C. conorii* κατά την ανάπτυξη του παράγει εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (Swaaf et al., 2003). Η αποφυγή ανασταλτικής δράσης λόγω αυξημένης συγκέντρωσης, απαιτεί την συμπλήρωση του νερού που εξατμίζεται, ή την υπερπλήρωση, αν απαιτείται να διατηρείται η αρχική συγκέντρωση του μέσου, σε ένα σταθερό επίπεδο, εφόσον υπάρχει κυτταρική ανάπτυξη. Αυτό οδηγεί στην κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων νερού. (Καλλιέργεια φυκών, Σπύρος Γκέλης 2018). Ως αποτέλεσμα, το συνολικό κόστος της βιομάζας φυκών που παράγεται σε ανοικτού τύπου καλλιέργειας, όπως οι δεξαμενές υδατοδιαδρόμου (raceway ponds) φθάνει τα 15-20 αμερικανικά δολάρια ανά κιλό (US \$ 15-20 kg⁻¹) και στα κλειστά συστήματα όπως οι φωτοβιοαντιδραστήρες ξεπερνάει τα 50 (> US \$ 50 kg⁻¹) (Borowitzka, 1997). Αντίθετα, η τιμή της βιομάζας που καλλιεργείται σε αντιδραστήρες ζύμωσης, δεν ξεπερνά τα 5 αμερικανικά δολάρια (<US \$ 5 kg⁻¹) (Gladue & Maxey, 1994).



Εικόνα 1.11 Υδατοδιάδρομοι καλλιέργειας μικροφυκών ([πηγή](#))

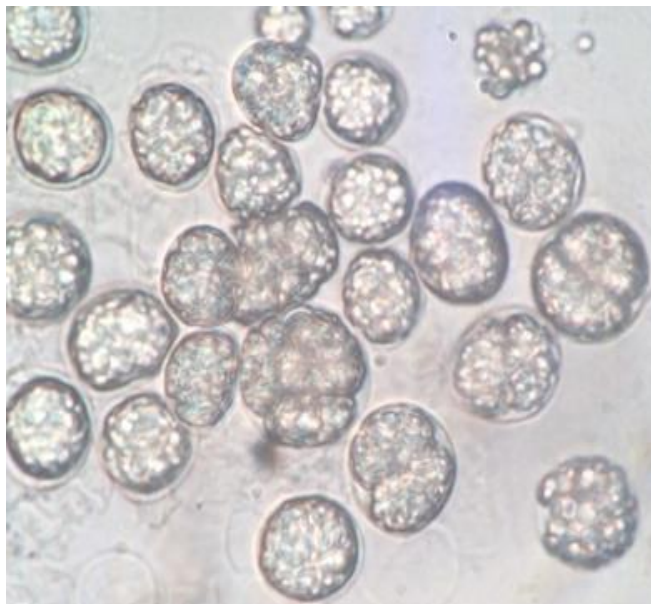
Οι ετερότροφικοί μικροοργανισμοί αποκτούν την απαιτούμενη μεταβολική ενέργεια μέσω οξειδωσης οργανικού υποστρώματος. Τα μικροφύκη συνεπώς, χρησιμοποιούν οργανικό άνθρακα, τόσο για ενέργεια όσο και για πηγή άνθρακα. Αυτό, οδηγεί ορισμένα είδη μικροφυκών σε μεγαλύτερη συσσώρευση λιπαρών οξέων, συγκριτικά με την φωτότροφη ανάπτυξη τους. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η *Chlorella protothecoides* κατά τη μετάβαση σε ετερότροφες από φωτοτροφικές συνθήκες καλλιέργειας, συσσωρεύσε συνολικά 40% παραπάνω λιπαρά οξέα (Χυ, 2006)

Χρησιμοποιώντας την ετερότροφη ανάπτυξη, έχουμε ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε λιπαρά, αφού η μέγιστη γνωστή παραγωγικότητα στη βιβλιογραφία είναι περίπου 20 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που επιτυγχάνεται μέσω της φωτοτροφικής καλλιέργειας (Καλλιέργεια φυκών, Σπύρος Γκέλης, 2018). Παρόλα αυτά, το ετεροτροφικό σύστημα το οποίο στηρίζεται στην παροχή σακχάρων, απαιτεί πολύ συχνά την αποστείρωση της πηγής άνθρακα, για να αποφευχθούν τα προβλήματα μόλυνσης.

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε αντιδραστήρες κάτω από στείρες συνθήκες, στο σκοτάδι εάν είναι απαραίτητο, κάτω από ένα εξαιρετικά ελεγχόμενο περιβάλλον (θερμοκρασία, διαλυμένο O₂, ροή αέρα, ταχύτητα ανάδευσης, έλεγχος pH, αλατότητα). Υπό σταθερές συνθήκες καλλιέργειας, επιτυγχάνεται και διατηρείται ταχεία ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων με επαναλήψιμο τρόπο, ο οποίος επιδέχεται βελτίωση μέσω έρευνας.

Στους αντιδραστήρες μπορούν ευκολότερα να προσδιοριστούν οι συνθήκες της καλλιέργειας και να περιοριστούν οι εξωτερικοί παράγοντες. Συνεπώς, η βελτιστοποίηση της διαδικασίας πραγματοποιείται ευκολότερα, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές πηγές DHA, όπου εμφανίζονται πολλές ανεξέλεγκτες εξωτερικές μεταβλητές, όπως για παράδειγμα το κλίμα και η εποχή, οι επιμολύνσεις και προσμίξεις των πρώτων υλών, τα μετεωρολογικά φαινόμενα, αλλά και οι ποσότητες και καταλληλότητα των αλιευμάτων.

Στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, μεγάλης κλίμακας αντιδραστήρες μπορούν να παράγουν πάνω από 100 g CDW l⁻¹. Οι καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας κυττάρων, καταλαμβάνουν σημαντικά λιγότερο όγκο. Μικρότερος όγκος σημαίνει ευκολότερη επεξεργασία και μεταποίηση κατά τη διάρκεια του σταδίου συγκομιδής, το οποίο, διαφορετικά, μπορεί να συμβάλλει στο ένα τρίτο του συνολικού κόστους παραγωγής (Barclay et al., 1987). Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το κόστος παραγωγής ζυμώσιμου DHA είναι, η κλίμακα και μέγεθος της καλλιέργειας και η συνολική παραγωγικότητα του DHA (mg DHA l⁻¹ h⁻¹) (Sijtsma et al., 1998). Η συνολική παραγωγικότητα του DHA εξαρτάται από την κυτταρική ανάπτυξη καθώς επίσης και από το ποσοστό λιπιδίων και DHA που συντίθεται εντός του κυττάρου.



Εικόνα 1.12 Κύτταρα του *C.conhii* κατά τη φάση λιπογένεσης (x100)

Αλλάζοντας τις περιβαλλοντικές και θρεπτικές πτυχές της καλλιέργειας, επηρεάζεται η περιεκτικότητα σε λιπίδια, αλλά και το προφίλ λιπαρών οξέων. Η παραγωγικότητα μεγιστοποιείται στις βέλτιστες προεπιλεγμένες συνθήκες. Για παράδειγμα, η χρήση υποστρωμάτων C₂, όπως το οξικό ή η αιθανόλη, φαίνεται να βοηθάει στο σχηματισμό λιπιδίων, καθότι παρέχονται στο κύτταρο πιο άμεσοι πρόδρομοι του ακετυλο-CoA, συγκριτικά με τα υποστρώματα που διαθέτουν ένα άτομο άνθρακα (π.χ. γλυκόζη) ή παραπάνω από 2 (Sijtsma και de Swaaf, 2004).

Μικρή διαλυμένη ποσότητα O₂ στην καλλιέργεια, μπορεί να μειώσει τον βαθμό ακορεστότητας ορισμένων οργανισμών, λόγω μειορρύθμισης των O₂-εξαρτώμενων δεσaturασών. Η ταχύτητα ανάδευσης και ο αερισμός της καλλιέργειας, που σχετίζονται με την παροχή O₂ επηρεάζουν την παραγωγικότητα ενός συστήματος, όπως έχει μελετηθεί και στην παραγωγή ισοδύναμων κακάο βουτύρου από το μύκητα *Mucor circinelloides*, συνομοταξίας (Mucormycota) (Roux κ.ά., 1995). Επί του παρόντος, οι

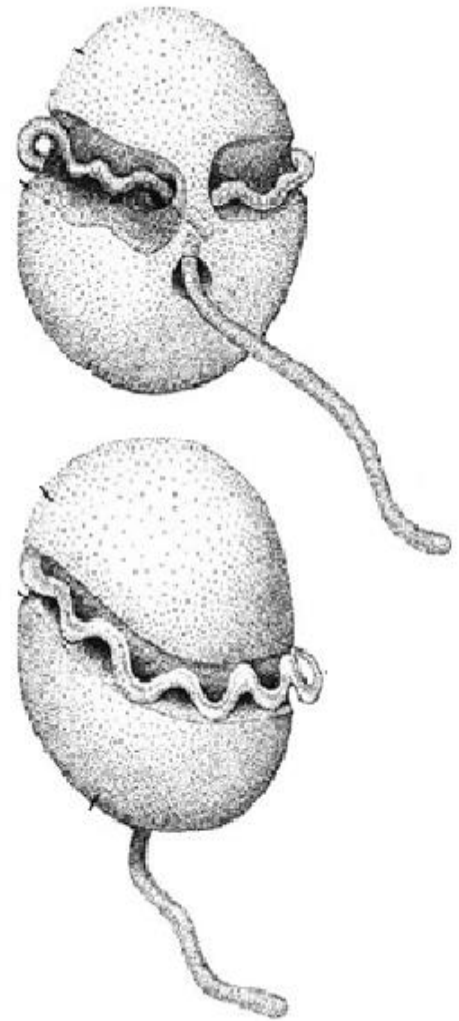
κύριες εμπορικές διαδικασίες που υπάρχουν για την παραγωγή μικροβιακού DHA, βασίζονται σε είδη που ανήκουν στα θραυστοχυτρίδια και στα δινωμαστιγωτά.

Τα θραυστοχυτρίδια είναι θαλάσσια, υποχρεωτικά ετερότροφα, που αναπτύσσουν εκτοπλασμικές ίνες, παρόμοια με το τρόπο που ακολουθούν οι μύκητες. Αρχικά ταξινομήθηκαν ως φυκομύκητες (rhizomycetes), λόγω των ομοιοτήτων τους με τους μύκητες (Henderson 1999), αλλά αργότερα ταξινομήθηκαν στο βασίλειο *Χρώμιστα* - *Chromista* (Cavalier-Smith et al., 1994). Σύμφωνα με τα μοριακά τους χαρακτηριστικά, τα οποία σχετίζονται στενά με τα φύκη. Το μικροφύκος *Schizochytrium sp.* είναι ένα θραυστοχυτρίδιο που μπορεί να περιέχει έως και 78,6% ποσοστό λιπαρών οξέων από το συνολικό ξηρό βάρος των κυττάρων (CDW), όπου το DHA αποτελεί το 33,3% (Yaguchi et al., 1997). Συγκεκριμένες διεργασίες σχετικά με το *Schizochytrium*, ισχυρίζονται παραγωγικότητες DHA έως και 417 mg l⁻¹h⁻¹ (Barclay et al., 2003). Ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα του *Schizochytrium* είναι η παραγωγή δοκοσαπεντανοϊκού οξέος (DPA) πέρα από DHA (Nakayama et al. 1996; Yokochi et al. 1998; Ratledge 2001). Οι θρεπτικές ιδιότητες του DPA δεν είναι ακόμα τελείως γνωστές οπότε η παρουσία του σε έλαια που προορίζονται για βρώση ή για φαρμακευτικές εφαρμογές, είναι ανεπιθύμητη. Ακόμα, λόγω της κοντινής δομής και χημικής συγγένειας που έχει με το DHA, ο διαχωρισμός των δύο είναι ακριβός και πολύπλοκος.

SCO παράγονται επίσης από το *Ulkenia sp.* (εξίσου θραυστοχυτρίδιο), που εμφανίζει παρόμοιο προφίλ λιπαρών οξέων με το *Schizochytrium sp.* Εμπορικά παράγεται από την Nutrinova GmbH, (Frankfurt, Germany), η οποία ανήκει στην Celanese Corporation - Hoechst Celanese από το 1997.

Υψηλά επίπεδα DHA βρίσκονται επίσης στη σύσταση λιπαρών δινωμαστιγωτών, όπως για παράδειγμα στους μικροοργανισμούς *Cryptocodinium cohnii* και *Amphidinium sp.* Τα δινωμαστιγωτά (συνομοταξία Dinoflagellata, του βασιλείου των Πρωτίστων), είναι ευκαρυωτικά μικροφύκη, που μπορούν να είναι ετερότροφα είτε φωτότροφα και απαρτίζουν σημαντικό κομμάτι του θαλάσσιου πλαγκτόν (Gobillard 1996; Sonnenborn & Kunau 1982). Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 είχαν αναπτυχθεί ήδη τουλάχιστον

δύο εμπορικές διαδικασίες παραγωγής ω-3 PUFAs, από ετερότροφες καλλιέργειες μικροφυκών (Barclay et al. 1994). Το μικροφύκος *C. conhii* αποτελεί μια πολύ καλή λύση παραγωγής DHA, αφού μπορεί και συσσωρεύει ποσότητες λιπιδίων που ξεπερνάνε το 50% του βάρους της συνολικής βιομάζας των ξηρών κυττάρων (de Swaaf et al., 2003), με πολύ υψηλό περιεχόμενο σε DHA, που μπορεί να φθάσει μέχρι και 70% του βάρους των συνολικών λιπαρών. Επιπρόσθετα, η διαδικασία απομόνωσης του DHA είναι σχετικά εύκολη και οικονομική (Ward 1996), λαμβάνοντας υπόψιν ότι στο προφίλ των λιπαρών οξέων δεν υπάρχει άλλο PUFA σε ποσότητα μεγαλύτερη του 1% (Harrington & Holz 1968; Beach & Holz 1973). Η πολύ μικρή παρουσία άλλων PUFAs και η απουσία άλλων άγνωστων λιπαρών οξέων και ουσιών, χάρισε στο μικροβιακό έλαιο που παράγει το μικροφύκος *C. conhii*, την πιστοποίηση GRAS (Generally Recognized As Safe) (Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές) από την Food & Drug Administration U.S. (FDA), για ανθρώπινη κατανάλωση. Το παραγόμενο έλαιο του *Schizochytrium sp.* κατέχει την πιστοποίηση GRAS μόνο για τροφές που προορίζονται για ζώα (Ward & Singh, 2005).



Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση του *Cryptothecodinium conhii* (Perret et al. (1991))

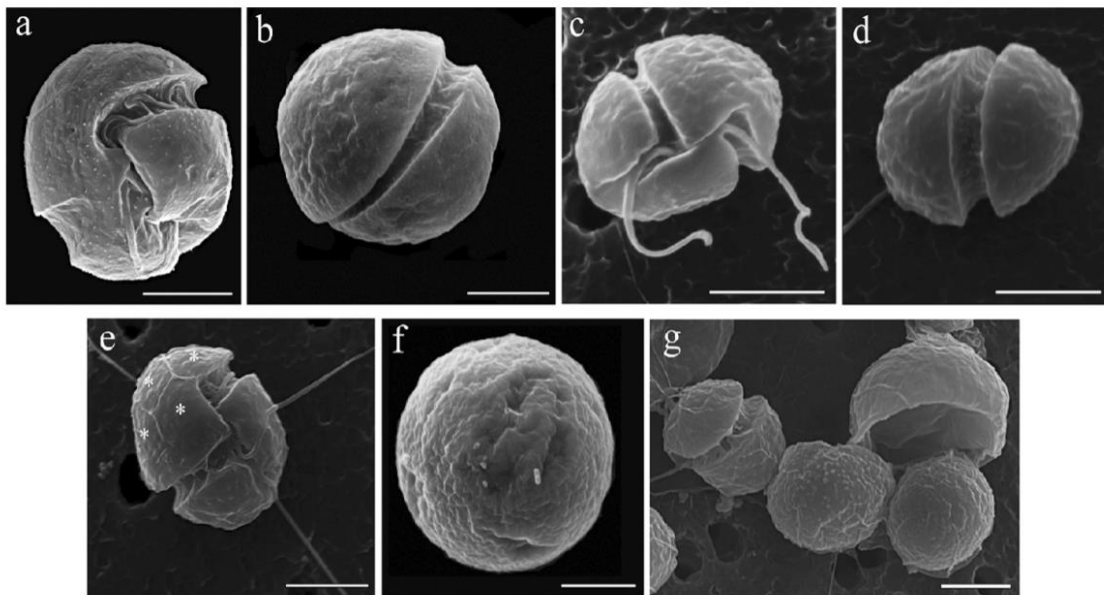
1.4 *CRYPTHOCODINIUM COHNII*

Η μελέτη του μικροφύκου *Cryptocodinium cohnii* (παλαιότερα γνωστό ως *Gyrodinium cohnii*) ξεκίνησε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα (Seligo 1887). Πρόκειται για έναν ετερότροφο οργανισμό που δεν διαθέτει χλωροπλάστες, εξού και η αδυναμία του να φωτοσυνθέσει. Η απαιτούμενη ενέργεια και ο άνθρακας των κυττάρων λαμβάνονται αμφότερα από το μεταβολισμό ενός οργανικού υποστρώματος. Στη φύση, μπορεί να βρεθεί στα θαλάσσια φύκια που βρίσκονται υπό σήψη. Η σχετική ευκολία με την οποία μπορούσε να καλλιεργηθεί ο *C. cohnii* συγκριτικά με άλλα ετερότροφα φύκια, ήταν το έναυσμα για να ξεκινήσουν έρευνες, με στόχο την βελτιστοποίηση της διαδικασίας και των συνθηκών ανάπτυξης του μικροφύκου (Beach & Holz 1973, Tuttle & Loeblich 1975).

Στις καλλιέργειές του *C. cohnii*, τα κύτταρα εμφανίζονται σε δύο μορφές· στην επιπλέοντα (στάσιμη) και στην κολυμβητική (Εικόνα 1.14). Όταν βρίσκονται στην επιπλέοντα μορφή, παρατηρούνται στάσιμα, καθώς είναι σε στάδιο ανάπαυσης / επιβίωσης είτε σε φάση διαίρεσης. Αντίθετα, στην κολυμβητική μορφή βρίσκονται συνεχώς σε κίνηση, χάρη στα δύο μαστίγια που διαθέτουν (ένα εγκάρσια και ένα κατά μήκος του κυττάρου (βλ. Εικόνα 1.13). Μία φυσιολογική ταχύτητα των κολυμβητικών κυττάρων είναι 1 m h⁻¹. Τα κύτταρα ανεξαρτήτως μορφής, αναλόγως την ανάπτυξη τους μπορεί να διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος (10-50 μm ή και παραπάνω). Διάφορες ομάδες ερευνητών έχουν μελετήσει την κυτταρική διαίρεση, αναπαραγωγή και κύκλο του *C. cohnii* λεπτομερώς (Tuttle & Loeblich 1975, Beam & Himes 1974, Ucko et al. 1997, Bhaud et al. 1991). Εκτός αυτού, το μικροφύκος φαίνεται να είναι ένας πολύ ενδιαφέρον μικροοργανισμός για να μελετηθούν τα σύνθετα και άγνωστα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των PUFAs.

Στην υδατοκαλλιέργεια, οι μικροβιακές πηγές θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικές για την κάλυψη της υψηλής διατροφικής ζήτησης σε PUFAs, ειδικά κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων ανάπτυξης, που οι απαιτήσεις είναι υψηλότερες και πιο επιτακτικές. Ως τώρα η υψηλότερη παραγωγικότητα DHA, επιτεύχθηκε με τη χρήση αιθανόλης ως πηγή άνθρακα και έφθασε τα 53 mg L⁻¹ h⁻¹. Σε διάστημα 220 ωρών παρήχθησαν 5 g L⁻¹ λιπαρά και 11.7 g DHA L⁻¹ (de Swaaf et al. 2003).

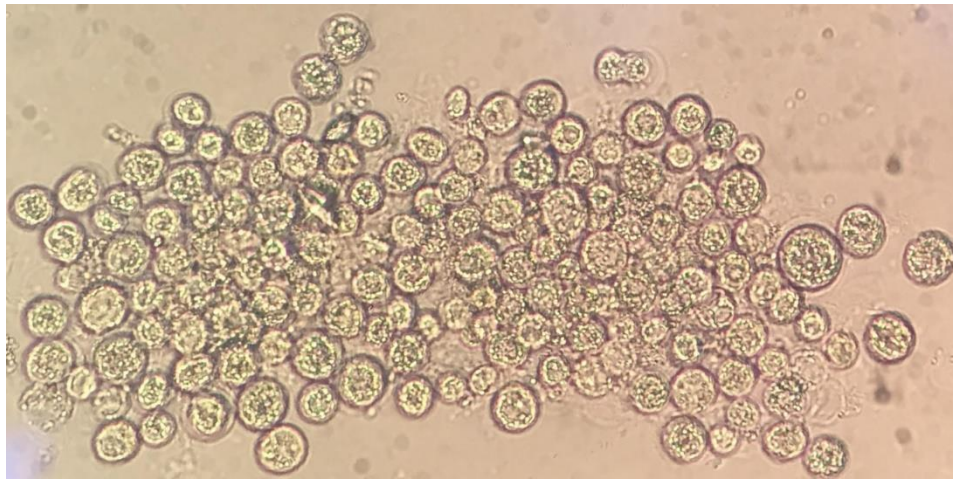
Η μικροβιακή βιομάζα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εμπλουτισμού ζωντανής λείας, κυρίως από δύο εταιρείες παραγωγής: την Aquafauna Bio-Marine, Inc. (Hawthorne, California, Η.Π.Α.) και την (ABN) Advanced BioNutrition Corp. (Columbia, Maryland, Η.Π.Α.). Η ABN το 2002 έγινε η μοναδική παγκοσμίως κάτοχος αδείας των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας της DSM (Koninklijke DSM N.V.) σχετικά με την παγκόσμια χρήση του DHA των μικροφυκών σε όλες τις ζωικές εφαρμογές και στη συνέχεια προχώρησε στη δοκιμή αυτού του υλικού για πρακτική και εμπορική εφαρμογή. Το 2004 παρήχθησαν οι πρώτες χορτοφαγικές γαρίδες, σε ερευνητικά αγροκτήματα που λειτουργούσαν από το Τμήμα Φυσικών Πόρων της Νότιας Καρολίνας χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της ABN. Η συνολική παραγωγή, σύμφωνα με την ίδια την εταιρεία, είναι φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεί βιώσιμη λύση υδατοκαλλιέργειας.



Εικόνα 1.14 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) του *C.conhii*, σε διαφορετικές μορφές και λήψεις, κλίμακα μπάρας: 5μm (Prabowo et al., 2013)

Εμπορική παραγωγή DHA μέσω ετερότροφης καλλιέργειας των μικροφυκών *C. Conhii* και *Schizochytrium sp.* ξεκίνησε από την OmegaTech Inc. (1985, Boulder, Colorado), που εξαγοράστηκε από την Martek Biosciences Corp. το 2002. Το 2004, οι Nutrinova και Martek Biosciences απορρόφησαν το 19% της αγοράς θρεπτικών ωμέγα-3, χρησιμοποιώντας τα μικροβιακά έλαια ως πρόσθετα βρεφικών τροφών (FPD, 2006).

Εν συνεχεία, η OmegaTech Inc. συγχωνεύθηκε και μετονομάστηκε σε Martek Biosciences Boulder Corporation (2008) παρότι συνέχισαν να λειτουργούν στα ήδη υπάρχοντα γραφεία της OmegaTech στο Boulder της πολιτείας του Κολοράντο. Τέλος η εταιρεία εξαγοράστηκε το 2011 από τη DSM για 1.1 (b\$) δισεκατομμύρια αμερικανικά δολάρια, όπου ανήκει μέχρι και σήμερα. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των ετών η εταιρεία καινοτόμησε στις τεχνολογίες μικροφυκών (Nicholson, 2010).



Εικόνα 1.15 Κύτταρα *C.conhii* (x40)

1.5 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

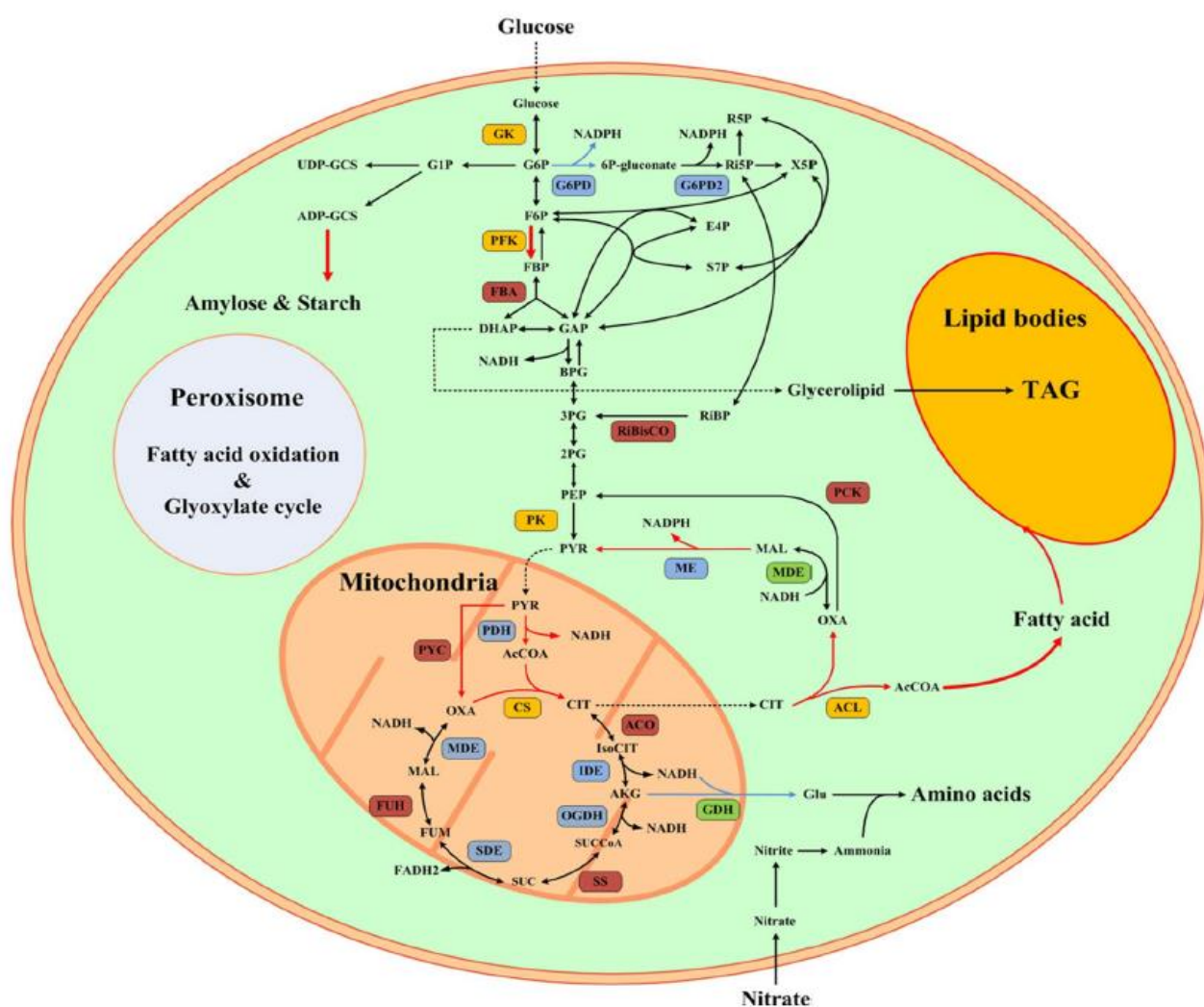
Η διαδικασία απομόνωσης και συσσώρευσης λιπιδίων έχει περιγραφεί για ετερότροφους οργανισμούς, οι οποίοι μέχρι στιγμής αποτελούν τη μοναδική εμπορική, δυνητικά εναλλακτική λύση, στην SCO βιομηχανία της παραγωγής PUFAs (Ratlidge, 2002a). Η λιπογένεση συνήθως συνδέεται με τον περιορισμό ορισμένων θρεπτικών συστατικών, εκτός από την πηγή άνθρακα, και ιδιαίτερα με την πηγή αζώτου (Gill et al., 1977; Granger et al., 1993; Ratlidge & Wynn, 2002). Οπότε, ρυθμίζοντας την αναλογία άνθρακα προς άζωτο στα κατάλληλα επίπεδα, προτρέπει η συσσώρευση λίπους. Σε αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας (κλειστού περιβάλλοντος – Batch culture) λαμβάνει μέρος μια διαδικασία δύο φάσεων. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από

ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων (εκθετική φάση ανάπτυξης) και ακολουθείται από την δεύτερη στατική φάση εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού, όπου ο υπόλοιπος άνθρακας κατανέμεται για παραγωγή λιπιδίων.

Τα βιοχημικά βήματα που οδηγούν στη συσσώρευση λιπιδίων μελετήθηκαν εκτενώς και αναθεωρήθηκαν από τον Ratledge (2002, 2004). Μετά την εξάντληση του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, η μικρής ποσότητας αμμωνία που βρίσκεται στην ενδοκυτταρική δεξαμενή της μονοφωσφορικής αδενοσίνης - adenosine monophosphate (AMP) προέρχεται από τη δράση της AMP δεαμινάσης – deaminase, κατά την οποία ένα μόριο AMP μετατρέπεται σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), απελευθερώνοντας ένα μόριο αμμωνίας. Ως αποτέλεσμα, η μειορρύθμιση – downregulation της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης - Isocitrate dehydrogenase (ICDH), η οποία είναι εξαρτώμενη από την AMP (μόνο στους ελαιώδεις μικροοργανισμούς), προκαλεί συσσώρευση κιτρικού στα μιτοχόνδρια, το οποίο μετέπειτα απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο.

Από βιοχημική άποψη, η συσσώρευση λιπιδίων απαιτεί την παρουσία του ενζύμου ATP – κιτρική λυάση – ATP citrate lyase (ACL) που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση του κιτρικού οξέος στο κυτοσόλιο και μετατροπή του σε ακέτυλο-CoA που χρησιμοποιείται ως δομικό στοιχείο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων (Ratledge & Wynn, 2002). Αυτό το ένζυμο είναι κάρριο στους περισσότερους ελαιούχους οργανισμούς, αλλά δεν είναι το μοναδικό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το διαδικασία συσσώρευσης λιπιδίων. Το μηλικό ένζυμο είναι επίσης απαραίτητο για τη διαδικασία, μετατρέποντας το μηλικό σε πυροσταφυλικό και παρέχοντας μια εσωτερική δεξαμενή NADPH για τη σύνθεση λιπιδίων. Για κάθε δομικό στοιχείο που προσκολλάται στην ανθρακική αλυσίδα λιπαρών, απαιτείται ένα μόριο ακέτυλο-CoA και η αναγωγή δύο μορίων NADPH. Κατόπιν τούτου, το ACL και το μηλικό ένζυμο είναι ζωτικής σημασίας για την παροχή των βασικών συστατικών για τη σύνθεση των λιπιδίων. Τα μικροβιακά λιπίδια εμπεριέχονται ως πρόσθετα, σε προϊόντα που καταναλώνονται καθημερινώς, όπως για παράδειγμα στο γάλα (Franklin et al., 1999) και στα αυγά (Lewis et al., 2000). Η “de novo” σύνθεση λιπαρών οξέων αναβολίζεται από το ενζυμικό σύμπλοκο της συνθετάσης λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthetase, FAS), καθιστώντας το υπεύθυνο για την επιμήκυνση της ακυλικής αλυσίδας. Αυτή η διαδικασία ξεκινάει, με την συμπύκνωση (εξαρτώμενη από το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης ATP) μεταξύ μηλονικού εστέρα και ακετυλο-CoA (acetyl-coA) από την 3-

κετοακυλο συνθάση. Αυτή η αντίδραση αποτελεί και το περιοριστικό παράγοντα του ρυθμού. Το ένζυμο 3-κετοακυλο αναγωγάση μαζί με το Νικοτιναμιδο-Αδενινο-Φωσφορικό-Δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ,NADPH) εισάγει τη ρίζα υδροξυλίου στη θέση C3 της αλειφατικής αλυσίδας. Η αφυδάτωση που πραγματοποιείται μεταξύ των θέσεων C1 και C3, από την 3-υδροξυακυλική αφυδατάση, παράγει το ενολικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την επακόλουθη αναγωγή από μια ενολική αναγωγάση. Ως αποτέλεσμα, η αρχική αλυσίδα ακυλίου επιμηκύνεται κατά δύο άτομα άνθρακα.



Εικόνα 1.16 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης λιπαρών οξέων (Guangsheng Pei. et al.,2017)

Επομένως, το παλμιτικό οξύ είναι το προϊόν διαδοχής επτά κύκλων επιμηκύνσεως, όπου το ακετυλο-CoA χρησιμοποιείται ως δομικό στοιχείο. Αυτό αποτελεί υποχρεωτικό βήμα για το σχηματισμό όλων των λιπαρών οξέων που απαντώνται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Η περαιτέρω σύνθεση των PUFAs απαιτεί μια αλληλουχία αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από μία εναλλασσόμενη σειρά ενζύμων δεσατουράσης και ελονγκάσης. Το παραπάνω συνιστά το “μακροπρόθεσμο” μονοπάτι για τη σύνθεση των PUFAs. Το λινολεϊκό οξύ (LA;18:2 n-6), το α-λινολενικό οξύ (ALA, 18: 3 n-3) και το ελαϊκό οξύ (18: 1 n-9) αποτελούν τους αρχικούς προδρόμους των αντιστοίχως n-6, n-3 και n-9 PUFAs. Όλα τα προαναφερθέντα, ανταγωνίζονται για το μεταβολισμό τους ως υποστρώματα του πρώτου ένζυμου του μονοπατιού, την -δεσατουράση. Το συγκεκριμένο ένζυμο ονομάζεται “εμπρόσθια” (“front-end”) δεσατουράση επειδή εισάγει την ακορεστότητα δίπλα από το καρβοξυλικό άκρο (το Δ6 υποδηλώνει απόσταση έξι ατόμων άνθρακα από τον α- ή καρβοξυλικό άνθρακα). Επίσης, οι ακόλουθες ελονγκάσες και δεσατουράσες ενεργούν δίπλα στο καρβοξυλικό άκρο της ακυλικής αλυσίδας, και ως αποτέλεσμα, η θέση του πρώτου διπλού δεσμού στην πλευρά του μεθυλικού άκρου διατηρείται στις μείζονες σειρές λιπαρών οξέων (n-3, n-6 και n-9). Γενικά, οι δεσατουράσες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τα αντίστοιχα n-6 υποστρώματα, κατόπιν με τα n-3 και τελικά με τα n-9 λιπαρά οξέα. Έτσι, το LA θα μπορούσε να παρεμβαίνει στην περαιτέρω μετατροπή του ALA και ως εκ τούτου η διατροφική αναλογία n-3 / n-6 πρέπει να διατηρείται σε κατάλληλα επίπεδα. Οι δεσατουράσες των λιπαρών οξέων είναι οξυγόνο-εξαρτώμενα (O₂-dependent) ένζυμα, όπου η πλειονότητα τους σχετίζεται με τη μεμβράνη (Klein & Volkmann, 1975, Meyer & Bolch, 1963). Κατ’ αναλογίαν, αυτό το μονοπάτι είναι γνωστό ως «αερόβιο μονοπάτι» ή «σύστημα δεσατουράσης / ελονγκάσης», το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των περισσότερων κοινών λιπαρών οξέων που υπάρχουν στη φύση. Όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, η λογική των αλυσωτών αντιδράσεων των ενζύμων ελονγκάση / δεσατουράση, καταδεικνύουν ότι το DHA είναι το προϊόν που προέρχεται από την Δ4-δεσατουράση (Qiuet al., 2001). Ωστόσο, απροσδόκητα, αυτό το ένζυμο δεν έχει απομονωθεί ακόμη από θηλαστικά. Εναλλακτικά, στοιχεία δείχνουν ότι συντίθεται DHA μέσω μιας επέκτασης του παραδοσιακού μονοπατιού που ονομάζεται «μονοπάτι Sprecher» (“Sprecher pathway”), όπου δε χρησιμοποιείται η Δ4-δεσατουράση

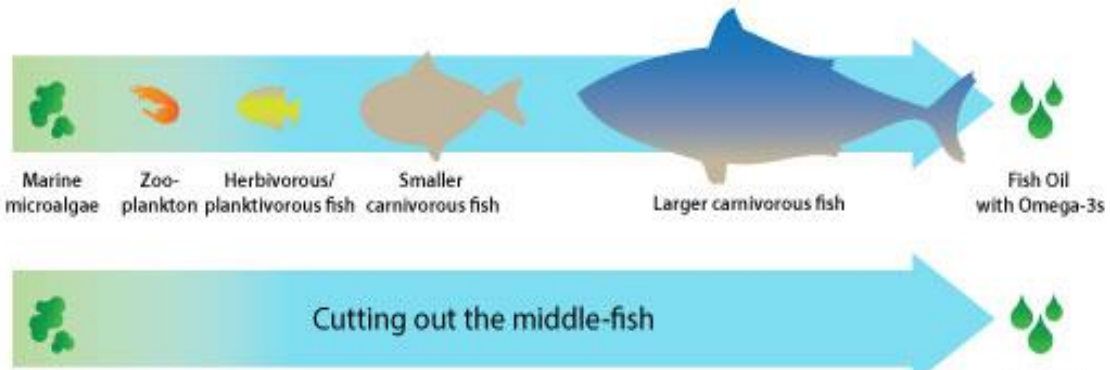
(Sprecher, 2002, Voss et al., 1991). Δύο διαδοχικές επιμηκύνσεις του EPA, ακολουθούμενες από τη δράση της Δ6-δεσατουράσης, παράγουν το λιπαρό οξύ 24:6 n-3. Τελικά, το 24:6 n-3 θα ολοκληρώσει έναν κύκλο υπεροϊσοσωμικής β-οξειδωσης για να παραχθεί DHA, 22:6 n-3. Συνεπώς, το μονοπάτι απαιτεί τη μετανάστευση του 24:6 n-3 από τη συνήθη θέση του στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στο υπεροξύσωμα. Αντίστοιχα, το μονοπάτι της n-6 επέκτασης παράγει δοκοσαπεντανοϊκό οξύ (Docosapentaenoic acid), DPA 22:5 n-6 από το 22:4 n-6, και πάλι χωρίς την εμπλοκή της Δ4-δεσατουράσης.

Νεούργημα στα προαναφερθέντα αποτελεί, μια εναλλακτική οδός για τη σύνθεση του DHA που μπορεί να εμφανίζεται σε μερικά θαλάσσια βακτηρίδια (*Shewanella* spp. και *Moritella marina*), και σε τουλάχιστον έναν ευκαρυώτη οργανισμό (*Schizochytrium* sp.), όπως έχει προταθεί (Metz et al., 2001). Η γενετική διαμόρφωση των βιοσυνθετικών λιπαρών οξέων σε αυτούς τους οργανισμούς υποδηλώνει ότι το DHA συντίθεται από ένα νέο σύμπλοκο συνθετάσης πολυκετιδίου (PKS) τύπου βακτηριδίου. Η κύρια διαφορά με το μονοπάτι που περιγράφεται παραπάνω είναι ότι το PKS δεν απαιτεί παρουσία οξυγόνου, για το σχηματισμό διπλού δεσμού (ακορεστότητα). Το συγκεκριμένο μονοπάτι είναι παρόμοιο (έως κάποιιο βαθμό) με το συμβατικό σύστημα Fatty acid synthase (FAS), μολαταύτα η ακυλο-αλυσίδα δεν ανάγεται μετά την αφυδάτωση και συνεπώς, οι ακορεστότητες διατηρούνται.

Αντ' αυτού, πραγματοποιείται ένας trans - cis ισομερισμός από ένα ένζυμο ισομεράσης. Το «συμβατικό» μονοπάτι απαιτεί ένα ενεργειακό πλεόνασμα δύο μορίων NADPH για την αναγωγή των φυσικώς σχηματισμένων διπλών δεσμών και για τη μεταγενέστερη δράση της δεσατουράσης λιπαρού οξέος. Κατόπιν τούτου, η PKS εισάγει τον διπλό δεσμό στην αλυσίδα ακυλίου με υψηλότερη ενεργειακή απόδοση από αυτή της συμβατικής οδού (Ratledge, 2004). Από οικολογική άποψη, η de novo σύνθεση των PUFAs περιορίζεται σε ορισμένα οικολογικά σημεία του πλανήτη, και κυρίως σε υδάτινα περιβάλλοντα. Τα λαχανικά είναι καλές πηγές βασικών λιπαρών οξέων με 18 άτομα άνθρακα, αλλά τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων θαλάσσιων ψαριών έχουν περιορισμένη ικανότητα να μετατρέψουν αυτά τα λιπαρά οξέα σε μακρά PUFA (Brenna, 2002). Με λίγες εξαιρέσεις, οι κύριοι παραγωγοί που είναι σε θέση να συνθέσουν de novo PUFA περιορίζονται στο υδάτινο περιβάλλον. Λόγω της βιολογικής σημασίας αυτών των λιπαρών οξέων, οι τροφικές αλληλεπιδράσεις σχετίζονται στενά με

την παρουσία τους (Masuda, 2003). Για παράδειγμα, μείζονα εξελικτικά επεισόδια του *Homo sapiens* έχουν συνδεθεί με τα υδάτινα περιβάλλοντα, μέσω λιπιδίων διατροφικής χρήσης, λόγω της ζωτικής σημασίας που έχουν τα PUFA στη νευρική ανάπτυξη (Broadhurst & Wang, 2002; Crawford et al., 1999). Επιπροσθέτως, τα PUFA προβλέπουν την μεταφορά άνθρακα μεταξύ των πρωτογενών παραγωγών και των καταναλωτών στα οικοσυστήματα γλυκών υδάτων (Muller-Navarra et al., 2004, 2000). Στη φύση, η τροφική αλυσίδα θα προσφέρει τελικά στα ψάρια την πλειονότητα των απαραίτητων PUFA μέσω της διατροφής (Ackman et al., 1964). Συγκεκριμένα, τα ψάρια και τα καρκινοειδή που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια δεν συνθέτουν το μεγαλύτερο μέρος των PUFA και συνεπώς βασίζονται σε λιπίδια της διατροφής, που προέρχονται από τη βιομηχανία μεταποίησης - επεξεργασίας ιχθύων (ελευθέρας αλιείας) (Swaaf, 2003). Συγκεκριμένα για τον *C.conhii*, παρατηρείται μειωμένη συσσώρευση λιπαρών κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, ενώ αυξάνει κατά τη γραμμική ανάπτυξη, λόγω περιορισμού κάποιου θρεπτικού, που επηρεάζει τον μεταβολισμό του μικροφύκου (de Swaaf et al. (2003).

Γι' αυτό το λόγο, στη βιομηχανία οι ζυμώσεις του *C.conhii*, πραγματοποιούνται συνήθως σε δύο στάδιο, όπως έχει αναφερθεί. Στο πρώτο στάδιο παρέχονται σε περίσσεια όλα τα θρεπτικά συστατικά για να επιτευχθεί μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη, με αναγκαστικά σχετικά χαμηλό ποσοστό λιπαρών (20% ξ.β. βιομάζας). Στο δεύτερο στάδιο ο περιορισμός του αζώτου και η συνεχής παροχή άνθρακα, βιο-μετατρέπουν το τελευταίο στο αποθηκευτικό λιπίδιο της τριακυλγλυκερόλης (TAG), που είναι πλούσιο σε DHA (Wynn et al. 2005. Σε αυτό το στάδιο, το μικροφύκος χάνει το μαστίγιο του και χάνει την «κολυμβητική» του μορφή. Είναι πολύ σημαντικό να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα η συγκέντρωση του άνθρακα, καθ' όλη τη διάρκεια της λιπογένεσης, τόσο για να ξεκινήσει η μεταβολική παραγωγή των λιπιδίων, αλλά και για να μην καταναλωθούν από τον ίδιο τον μικροοργανισμό τα ήδη σχηματισμένα λιπαρά (Wynn et al. 2005). (Chen & Johns 1991).



Εικόνα 1.17 (πηγή)

1.6 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΑ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ *CRYPTHOCODINIUM CONHII*

Έχουν δοκιμαστεί πολλές και διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή PUFAs όπως: α) λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua* L.) (Mendes, 2007) β) αραιωμένο σιρόπι οργανικής πούλπας (1:10.5 v/v) (Mendes, 2007a), γ) ουρία (Mendes, 2006), δ) γλυκόζη – σεσαμίνη (Liu, 2015), ε) η γλυκερόλη (Mendes, 2009), αν και υπάρχουν άλλες έρευνες που παρουσίασαν πολύ μικρή ανάπτυξη του μικροφύκου στη γλυκερόλη (de Swaaf et al., 1999), έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στα μικροφύκη *Schizochytrium limacinum* (Chi, 2007) και *Chlorella* (O’Grady, 2010) και ζ) καλαμποκέλαιο και τυρόγαλα (cheese whey) (Isleten-Hosoglu, 2017).

Πίνακας 1.5 Σύγκριση διαφορετικών πηγών άνθρακα για παραγωγή DHA, μέσω καλλιέργειας του *C.conhii*

<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Nitrogen source	Carbon source	Fermentation time (h)	DCW(g/L)	DHA (g/L)	DHA productivity (mg/L/h)	DHA yield mg/g	References
CCMP 316	Yeast extract	Glycerol	168.0	7.3	0.36	2.1	19.73]	Isleten-Hosoglu and Elibol ¹⁶
CCMP 316	Yeast extract	Carob syrup	100.4	42.0	1.90	18.5	n.a. ^a	Mendes, et al. ¹⁹
ATCC 30772	Yeast extract	Ethanol	220.0	83.0	11.70	53.2	43.7	De Swaaf, et al. ¹⁷
ATCC 30772	Yeast extract	Acetic acid	400.0	109.0	19.00	47.5	22.7	De Swaaf, et al. ¹¹
ATCC 30772	Yeast extract	Glucose	91.0	27.7	1.60	17.6	21.1	De Swaaf, et al. ¹⁸
CCMP 316	Yeast extract	Glucose	135.2	21.5	1.32	9.8	n.a. ^a	Da Silva, et al. ⁴⁶
M-1-2	Yeast extract	Glucose	168.0	71.2	9.59	57.1	47.7	This study

Οι υψηλότερες παραγωγικότητες DHA έχουν επιτευχθεί με τη χρήση οξικού οξέος και αιθανόλης (Πίνακας 1.5 Σύγκριση διαφορετικών πηγών άνθρακα για παραγωγή DHA, μέσω καλλιέργειας του *C.conhii*). Ωστόσο, και τα δύο αυτά υποστρώματα παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα και μειονεκτήματα. Η χρήση του οξικού σε μεγάλη κλίμακα απαιτεί ειδική διαχείριση. Πρέπει να αποφεύγεται οποιαδήποτε επαφή με το ανθρώπινο δέρμα και να αντιμετωπιστεί η διαβρωτική του ιδιότητα. Αυτό αυξάνει το κόστος του εξοπλισμού, λειτουργίας και συντήρησης, ειδικά στις μεγάλες μονάδες ζυμώσεων. Το οξικό πωλείται στην αγορά μεταξύ \$0.40 - \$0.60 σχεδιασμός (Jones, 2009). Σχεδόν το 75% του οξικού που χρησιμοποιείται στη χημική βιομηχανία προέρχεται από την καρβονυλίωση της μεθανόλης. Συνάγεται λοιπόν άμεση σχέση της τιμής του οξικού, με τη τιμή της μεθανόλης. Αν υπάρξει αύξηση στη τιμή της τελευταίας θα προκληθεί αύξηση και στη τιμή του οξικού η οποία μπορεί να προκαλέσει διακυμάνσεις στη τιμή της πρώτης ύλης και να δυσκολευθεί ο εμπορικός σχεδιασμός.

Επίσης, αν η διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης, απαιτεί υψηλής καθαρότητας οξικό, τότε το κόστος της πρώτης ύλης ανεβαίνει εκθετικά. Η αιθανόλη από την άλλη, αποτελεί ένα προϊόν αξίας χωρίς να απαιτείται κάποια περαιτέρω μεταποίηση, καθώς βρίσκει εφαρμογή ως α) βιοκαύσιμο, β) πρόδρομος διαφόρων χημικών ουσιών, γ) αντισηπτικό και δ) ψυχαγωγικό προϊόν κατανάλωσης των ανθρώπων. Λόγω και της

τελευταίας αυτής ιδιαίτερης εφαρμογής, απαιτείται ειδικός έλεγχος των μονάδων που χρησιμοποιούν αιθανόλη ως πηγή άνθρακα, για να αποφευχθεί η χρήση της σε άλλους τομείς με διαφορετικό φορολογικό και νομοθετικό πλαίσιο. Επίσης, λόγω της ευφλεκτότητας που την χαρακτηρίζει, η μεταφορά και αποθήκευση της απαιτεί αραίωση, η οποία αυξάνει το κόστος εξοπλισμού αποθήκευσης (καθώς αυξάνει ο απαιτούμενος όγκος) και το κόστος μεταφοράς, με την αύξηση του βάρους.

Ως εκ τούτου, πρέπει να βρεθούν διαφορετικές πηγές άνθρακα οι οποίες θα είναι πιο κατάλληλες για παραγωγή PUFAs μεγάλης κλίμακας και δε βρίσκουν κάποια άλλη σημαντική εφαρμογή. Αυτό οδηγεί στην μείωση των αποβλήτων και στη μετατροπή προϊόντων χαμηλής αξίας σε προϊόντα υψηλής αξίας προάγοντας την αειφόρο ανάπτυξη μέσα από βιώσιμες λύσεις τεχνολογικής ανάπτυξης. Η χρήση λιγνοκυτταρινούχου φυτικής βιομάζας φαίνεται να αποτελεί μια υποσχόμενη εναλλακτική πηγή άνθρακα καθώς συνάδει με τα παραπάνω και έχει χαμηλό κόστος (μπορεί να φθάσει τα 10 ευρώ/τόνο ή και χαμηλότερα) (Marumba, 2004), σε αντίθεση για παράδειγμα με το πολύ υψηλότερο κόστος της αιθανόλης και του οξικού που είναι 300 και 340 ευρώ/τόνο αντίστοιχα (De Swaaf et al. 2003a; De Swaaf et al 2003b; Sijtsma et al. 2005) Η εκμετάλλευση προϊόντων μικρής αξίας (όπως είναι τα μη επεξεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, που αποτελεί κύριο παραπροϊόν του αγροτικού τομέα), και η μετατροπή τους σε προϊόντα με αξία, αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την ορθή και βιώσιμη τεχνολογική ανάπτυξη. Τα μικροφύκη μπορούν να καταβολήσουν, μια πληθώρα οργανικών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, όπως είναι η γλυκερόλη, η γλυκόζη, η γλυκερόλη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, η λακτόζη, η γαλακτόζη και η μαννόζη (Liang, 2009). Συνεπώς, ερευνητές και μελέτες εστιάζουν στην εύρεση εναλλακτικών φθηνών πηγών άνθρακα, όπως είναι π.χ. τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, αντί της χρήσης καθαρών πηγών.

Η σχετικά σταθερή παραγωγή, (έντονα μετεωρολογικά φαινόμενα και κλιματικές αλλαγές μπορεί να προκαλέσουν διακυμάνσεις), αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Μπορεί να εξασφαλίσει μακροπρόθεσμα μεγάλης κλίμακας, προμήθεια πρώτης ύλης, με ομοιόμορφα ποιοτικά χαρακτηριστικά, για να διευκολυνθεί ο ορθός εμπορικός σχεδιασμός. Ειδικά οι νέες καλλιέργειες παρουσιάζουν

σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις ανά εδαφική μονάδα από τις συμβατικές. Αυτές οι υψηλότερες αποδόσεις βελτιώνουν την οικονομικότητά τους και ελαχιστοποιούν: α) τις απαιτήσεις σε έδαφος, β) τα αγροχημικά και τα λιπάσματα, γ) τα μεταφορικά κόστη καθώς και δ) τις αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Λαμβάνοντας υπόψη τα πολλαπλά οφέλη αξιοποίησης της βιομάζας, αλλά και τις ιδιότητες του ελληνικού αγροτικού τομέα, οι καλλιέργειες αυτές αντιπροσωπεύουν μια ελκυστική βιώσιμη λύση, τόσο για την παραγωγή ΡUFA, όσο και για την αύξηση της ανταγωνιστικότητας του αγροτικού χώρου, αύξηση του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (ΑΕΠ) σε εθνικό επίπεδο, την ενίσχυση της απασχόλησης και την προστασία του περιβάλλοντος.

1.7 Η ΦΥΤΙΚΗ ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΟ ΒΙΟΜΑΖΑ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΡUFAS

1.7.1 Λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα

Με τον όρο λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα - λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αναφέρονται οι υπολειμματικές μορφές βιομάζας, όπως τα υπολείμματα γεωργικών καλλιεργειών (στελέχη, κλαδιά, φύλλα, άχυρο), διάφορα ενεργειακά φυτά που διακρίνονται σε σακχαρούχα φυτά (σακχαροκάλαμο, σόργο, σακχαρότευτλο), αμυλούχα φυτά (σπόροι σιτηρών), καθώς και ενεργειακά φυτά που διαθέτουν λιγνινοκυτταρινούχο σύσταση (ευκάλυπτος, ψευδοκακία, κενάφ, κυτταρινούχο σόργο, μίσχανθος, αγριαγκινάρα, switchgrass, καλάμι), η βιομάζα δασικής προέλευσης (υπολείμματα επεξεργασίας ξύλου, καυσόξυλα) και τέλος τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων, υπολείμματα παραγωγής βαμβακιού). Ανάλογα την προέλευση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας, διαφοροποιείται και η σύσταση της. Γενικά όμως, αποτελούνται από κυτταρίνη στη μεγαλύτερη αναλογία (~45% του ξηρού βάρους),

ημικυτταρίνη (~30% του ξηρού βάρους) και λιγνίνη (~25% του ξηρού βάρους) (Almin, 1972).

1.7.2 Κύρια συστατικά λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Κάθε λιγνινοκυτταρινούχο υλικό αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Όμως, βρίσκονται και σε μικρότερες ποσότητες εκχυλίσιμων συστατικών, όπως οξέα, άλατα και ανόργανες ενώσεις (Wyman, 1994). Το φαινυλοπροπάνιο είναι η βασική θεμελιώδης μονάδα της λιγνίνης, η οποία σχηματίζει συσσωματώματα σε ένα πολυκλαδικό και πολύπλοκο δίκτυο.

Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, του οποίου η διάσπαση είναι καθοριστικής σημασίας, έτσι ώστε να επιτευχθεί αποδοτική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης προς μονομερή σάκχαρα. Αντίθετα, αυτό δε μπορεί να συμβεί με τη λιγνίνη, η οποία εμποδίζει την πρόσβαση των κυτταρινασών και δεσμεύει τα υδρολυτικά ένζυμα (McMillan, 1994).

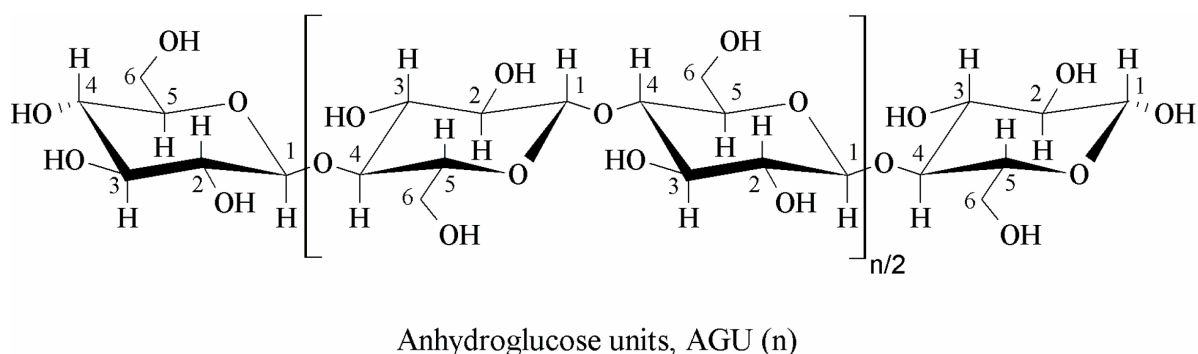
Πίνακας 1.6 Σύσταση μερικών λιγνοκυτταρινούχων υλικών

Λιγνοκυτταρινούχα υλικά	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη(%)
Κοτσάνι σκληρού ξύλου	40-55	24-40	18-25
Κοτσάνι μαλακού ξύλου	45-50	25-35	25-35
Κέλυφος καρυδιού	25-30	25-30	30-40
Σπάδικας αραβόσιτου	45	35	15
Γρασίδι	25-40	35-50	10-30
Χαρτί	85-99	0	0-15

Ειδικότερα, τα μακρομόρια της κυτταρίνης είναι προσανατολισμένα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ινώδεις μικροδομές γνωστές ως μικροϊνίδια (microfibrils) με αναλογία 15-40 μακρομόρια ανά μικροϊνίδιο. Στη συνέχεια, μερικά μικροϊνίδια συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν τα κυτταρικά ινίδια (fibrils), τα οποία με τη σειρά τους συμπλέκονται με τη βοήθεια των άμορφων μακρομοριακών αλυσίδων των ημικυτταρίνων και της λιγνίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό των ινών (fibers). Τελικά, αυτά τα 3 στοιχεία προσδίδουν μηχανικές αντοχές στον οργανισμό που ανήκουν, καθώς η κυτταρίνη προσδίδει ακαμψία στους φυτικούς ιστούς, ενώ οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη προσδίδουν αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση, με τη λιγνίνη να έχει και το ρόλο του συνδετικού υλικού στην ευρύτερη δομή.

1.7.2.i Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι το βασικό δομικό συστατικό στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και βρίσκεται σε μια οργανωμένη ινώδη δομή. Η δομή της κυτταρίνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.18.



Εικόνα 1.18 Απεικόνιση της αλυσίδας της κυτταρίνης (Marques-Marinho & Vianna-Soares 2013)

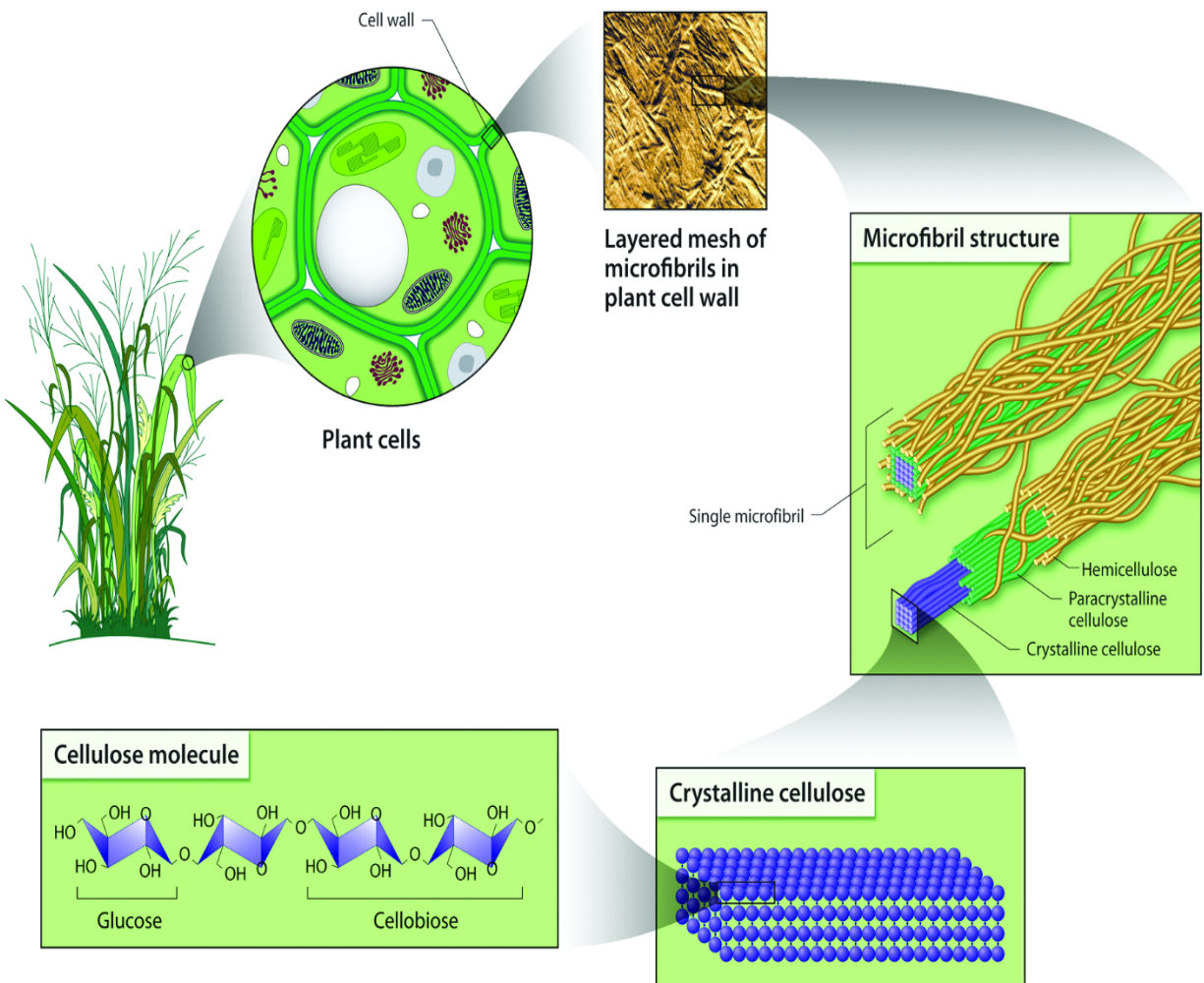
Αυτό το γραμμικό πολυμερές αποτελείται από υπομονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με β-(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς, με μέσο βαθμό πολυμερισμού από 100 έως 20000 (Zhang & Lynd, 2004). Ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη, είναι η επαναλαμβανόμενη μονάδα που δημιουργείται μέσω της περιστροφής του δακτυλίου γλυκοκυρανόζης (μονομερές D-γλυκόζης) κατά 180°, γύρω από το γλυκοζιδικό δεσμό. Συνεπώς, σχηματίζονται αλυσίδες κυτταρίνης με εξαιρετική αντοχή και σταθερότητα. Οι μακρές αλυσίδες του πολυμερούς της κυτταρίνης συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου (μεταξύ των δακτυλίων είτε μέσα στην ίδια την αλυσίδα, είτε μεταξύ γειτονικών αλυσίδων) και δυνάμεις van der Waals (μεταξύ γειτονικών αλυσίδων), οι οποίες προκαλούν την στοίχιση της κυτταρίνης σε μικροϊνίδια και συσσωματώματα. Οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη καλύπτουν αυτά τα μικροϊνίδια.

Η κυτταρίνη στη βιομάζα εμφανίζεται σε δύο μορφές, την κρυσταλλική και την άμορφη. Η κρυσταλλική κυτταρίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρίνης, ενώ ένα μικρό ποσοστό των ανοργάνωτων αλυσίδων κυτταρίνης σχηματίζουν άμορφη κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι πιο ευαίσθητη στην ενζυμική αποικοδόμηση στην άμορφη μορφή (Beguin, 1994).

Ο βαθμός οργάνωσης στο εσωτερικό μιας αλυσίδας και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων ποικίλει. Υπάρχουν περιοχές που διακρίνονται από υψηλό βαθμό κρυσταλλικότητας και οργάνωσης, ενώ σε άλλες περιοχές κυριαρχεί η αταξία και χαρακτηρίζονται ως άμορφες. Ο βαθμός κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης κυμαίνεται μεταξύ 50% και 90% (Fan & Lee, 1983). Η ανθεκτικότητα της κυτταρίνης στην ενζυμική υδρόλυση οφείλεται στο μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας της, στις ισχυρές εσωτερικές δυνάμεις που σχηματίζονται και στις προσμίξεις της με λιγνίνη και ημικυτταρίνη, που προσφέρουν ακόμα μεγαλύτερη στήριξη στη δομή (Newcomb, 2005). Συνεπώς, όσο περισσότερες είναι οι κρυσταλλικές περιοχές, συγκριτικά με τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, τόσο μεγαλύτερη αναμένεται να είναι η ανθεκτικότητα της στην ενζυμική υδρόλυση.

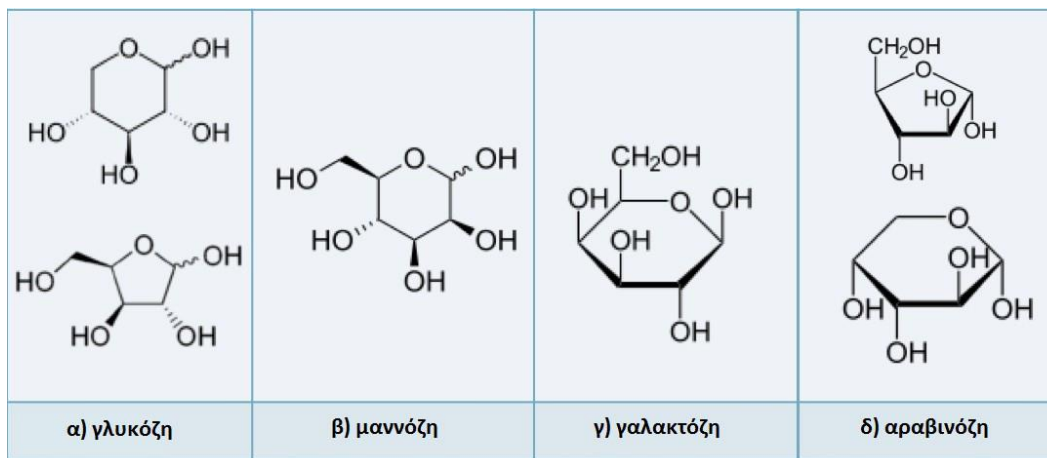
1.7.2.ii Ημικυτταρίνη

Με τον όρο ημικυτταρίνη εννοείται ένα μίγμα ποικίλων και διασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών (δίκτυο ετεροπολυμερών). Αντίθετα με την κυτταρίνη, η οποία είναι ένα ομοπολυμερές μορίων γλυκόζης συνδεδεμένων με β -(1,4)-γλυκοζιδικούς δεσμούς, η ημικυτταρίνη περιλαμβάνει διάφορα σάκχαρα και πολλά είδη γλυκοζιδικών δεσμών. Αυτό συντελεί στο σχηματισμό μίας άμορφης δομής ασθενών δυνάμεων (Shrotri, 2017). Η ημικυτταρίνη, σχηματίζει διακλαδώσεις βραχέων πλάγιων αλυσίδων (διαφόρων σακχάρων) και έχει χαμηλό βαθμό πολυμερισμού καθ' ότι περιλαμβάνει συνήθως 50-200 μονάδες σακχάρων), (Pereira, 2007).



Εικόνα 1.19 Δομή της φυτικής κυτταρίνης (πηγή)

Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Επιπροσθέτως, είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστικότητα. Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Στο κυτταρικό τοίχωμα, οι ξυλάνες εντοπίζονται κυρίως στην ενδιάμεση περιοχή ανάμεσα στη λιγνίνη και το πλέγμα των μικροϊνιδίων κυτταρίνης των δευτερογενών κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Η ξυλάνη αποτελεί περίπου το ένα τρίτο της ανανεώσιμης πηγής άνθρακα στον πλανήτη.



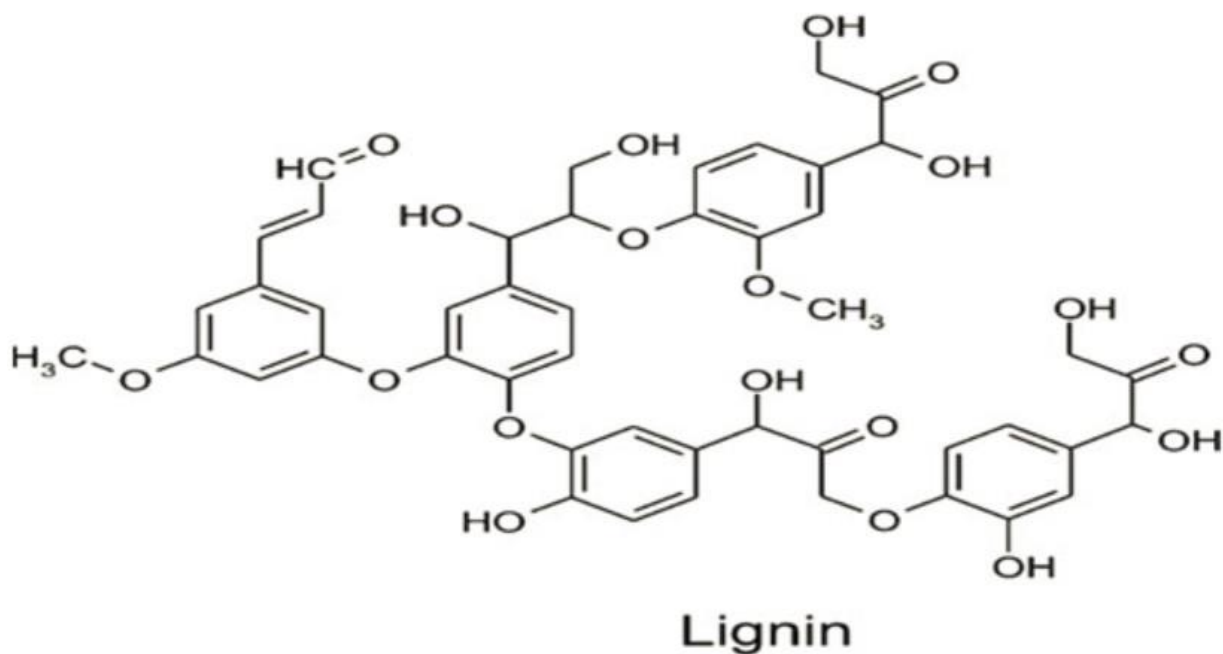
Εικόνα 1.20 Διάφοροι μονοσακχαρίτες παρόντες

1.7.2.iii Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα διακλαδισμένο, απροσδιόριστο δομικά, υδροφοβικό, αρωματικό πολυμερές, τρισδιάστατης δομής. Είναι παρούσα στο κύριο κυτταρικό τοίχωμα, προσδίδοντας δομική υποστήριξη, αδιαπερατότητα, και αντίσταση κατά μικροβιακών επιθέσεων (Perez, 2002). Τρεις φαινυλοπροπιονικές αλκοόλες εμφανίζονται ως μονομερή της λιγνίνης: κονικυλική, κουμαρμηλική, και σιναπυλική αλκοόλη. Το ποσοστό

της λιγνίνης στο ξύλο ποικίλει από 17-35%, όπου τα ποώδη φυτά έχουν το χαμηλότερο περιεχόμενο της λιγνίνης, ενώ τα μαλακά ξύλα εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά.

Η λιγνίνη στο ξύλο παίζει το ρόλο της συγκολλητικής ουσίας, και είναι υδρόφοβη και πολύ ανθεκτική. Ο βιολογικός προορισμός της είναι η ενίσχυση της μηχανικής αντοχής των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ενώνεται με χημικούς δεσμούς με τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη. Η διόγκωσή της είναι χαμηλή. Υδρολύεται δύσκολα, κυρίως με αλκαλικά διαλύματα σε υψηλές θερμοκρασίες (150-180° C), ενώ είναι αδιάλυτη στους γνωστούς διαλύτες, όπως για παράδειγμα το νερό. Τέλος, η λιγνίνη συγκεντρώνεται κυρίως στη μεσοκυττάρια στρώση, συγκρατεί τα μικροϊνίδια και βελτιώνει την αντοχή τους σε θλίψη.



Εικόνα 1.21 Η δομή της λιγνίνης (Rangaswami G & P Bagyaraja. Agricultural Microbiology. 2nd. Prentice Hall of India, 1993).

1.7.3 Υδρόλυση της βιομάζας

Παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση της κυτταρίνης αποτελούν η κρυσταλλικότητα των ινών κυτταρίνης, το πορώδες (αύξηση επιφάνειας) των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, και το περιεχόμενο τόσο της λιγνίνης όσο και της ημικυτταρίνης (McMillan, 1994)., που αποτελούν αναστολείς της δράσης των κυτταρινασών.

Η παρουσία λιγνίνης και ημικυτταρίνης καθιστά πιο δύσκολη την πρόσβαση των κυτταρινολυτικών ενζύμων και των οξέων στην κυτταρίνη, μειώνοντας την συνολική απόδοση της υδρόλυσης. Ωστόσο, υπάρχουν διάφορα ένζυμα που μπορούν και υδρολύουν την ημικυτταρίνη, όπως είναι οι αραβινοφουρανοσιδάσες, ξυλανάσες, γλουκουρονοζιδάσες, ακετυλοεστεράσες και εστεράσες του φερουλικού οξέος (Duff & Murray, 1996).

Η τυχαία δομή της λιγνίνης και οι ισχυροί δεσμοί μεταξύ των μονομερών της, την καθιστούν εξαιρετικά ανθεκτική στη διαδικασία της μικροβιακής αποικοδόμησης. Ενώ πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομούν μερικά από τα συστατικά του μορίου της λιγνίνης, μόνον ένας μικρός αριθμός μπορεί να αποδομεί την εσωτερική δομή της. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι μύκητες λευκής σήψης (white rot fungi).

1.7.4 Μέθοδοι προκατεργασίας βιομάζας

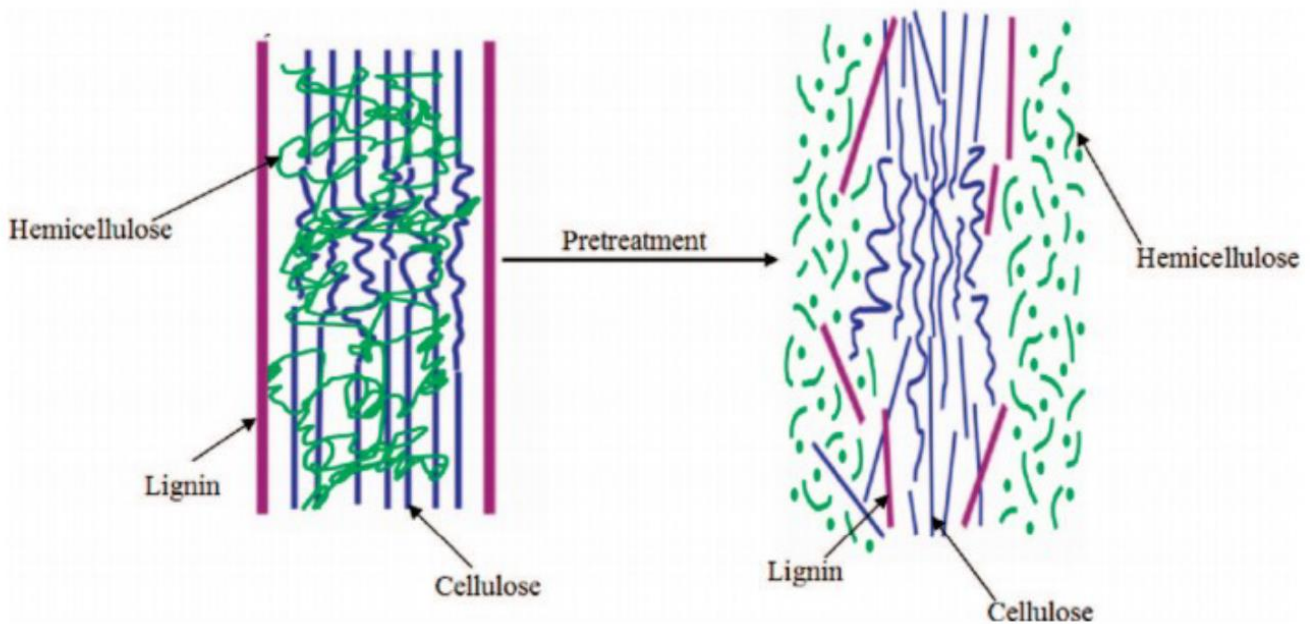
Η προκατεργασία της πρώτης ύλης, πραγματοποιείται με σκοπό την αύξηση της επιδεκτικότητας του υλικού για το επόμενο στάδιο επεξεργασίας που είναι η υδρόλυση του βιοπολυμερούς σε μικρότερα συσσωματώματα, και τελικά σε μονοσακχαρίτες.

Το στάδιο φυσικής ή χημικής προεπεξεργασίας απαιτείται κυρίως για να αυξηθεί η επιδεκτικότητα του πολυσακχαρίτη, στις εκάστοτε δράσεις των ενζύμων. Με αυτό το

τρόπο μπορεί να αλλάξει η δομή και η σύσταση της βιομάζας ως χημική σύνθεσή, έτσι ώστε η υδρόλυση του υδατανθρακικού κλάσματος σε μονομερή σάκχαρα να μπορεί να επιτευχθεί γρηγορότερα και με καλύτερη αποδόση. Η υδρόλυση συνήθως καταλύεται από οξέα ή κυτταρινολυτικά ένζυμα, και η ζύμωση διεξάγεται από ζύμες ή βακτήρια.

Η απομάκρυνση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης, η μείωση της κρυσταλλικότητας κυτταρίνης και η αύξηση του

πορώδους μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την διαδικασία υδρόλυσης μέσω μεθόδων προ επεξεργασίας (McMillan1994)



Εικόνα 1.22 Ο ρόλος της προκατεργασίας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

(Parveen, 2009)

Γενικά, οι μέθοδοι προεπεξεργασίας των λιγνοκυτταρινούχων υλικών θα πρέπει: (α) να αποτρέπουν το σχηματισμό παρεμποδιστών που μπορούν να μειώσουν την απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης (β) να ελαχιστοποιούν την απώλεια των

υδατανθράκων, (γ) να ενισχύουν το σχηματισμό των σακχάρων και (δ) να είναι οικονομικά βιώσιμες (Sun & Cheng, 2002).

Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές κατηγορίες:

- φυσικές (μηχανικός κατακερματισμός, άλεση, πυρόλυση),
- φυσικοχημικές (έκρηξη ατμού, υδροθερμόλυση, έκρηξη CO₂),
- χημικές (άλκαλική ή όξινη υδρόλυση, οζονόλυση)
- βιολογικές, ή συνδυασμός αυτών.

Οι διαδικασίες υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνουν τη χρήση οξέος (όξινη υδρόλυση), είτε ενζύμων (ενζυμική υδρόλυση). Σε παραδοσιακές μεθόδους που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια 19ου και στις πρώτες δεκαετίες του 20ου αιώνα, η υδρόλυση πραγματοποιούνταν με αντίδραση της κυτταρίνης και παρουσία κάποιου οξέος. Το αραιωμένο οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και πίεσης, ενώ το πυκνό οξύ μπορεί να εφαρμοστεί και σε πιο ήπιες συνθήκες (χαμηλότερη θερμοκρασία και ατμοσφαιρική πίεση).

Επίσης, σε ήπιες συνθήκες (pH= 4,8 και θερμοκρασία 45 - 50 °C) πραγματοποιείται και η ενζυμική υδρόλυση. Συμπεριλαμβάνοντας και την απουσία διάβρωσης του εξοπλισμού, η ενζυμική υδρόλυση καθίσταται φθηνότερη συγκριτικά με την όξινη. (Duff & Murray, 1996). Ακόμα, η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης είναι υψηλότερη από την απόδοση της όξινης υδρόλυσης, καθ' ότι οι υδρολάσες καταλύουν μόνο τις αντιδράσεις υδρόλυσης και όχι τις αντιδράσεις αποδόμησης των σακχάρων

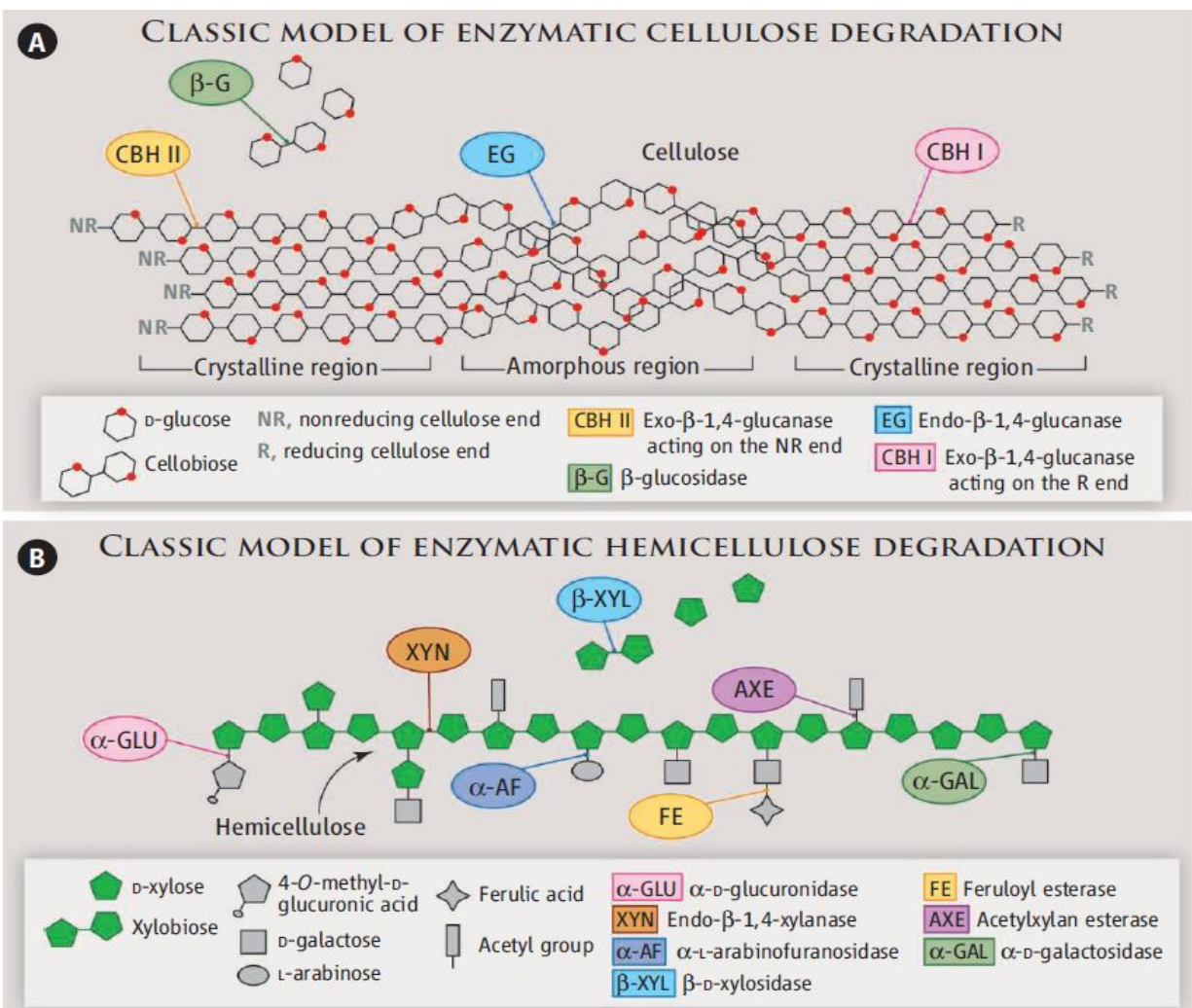


Εικόνα 1.23 Προκατεργασμένες λιγνοκυταρινούχες βιομάζες

(Parisi, 1989), ενώ υφίσταται χαμηλή παραγωγή παραπροϊόντων κατά την υδρολυτική διαδικασία.

Κυτταρινάσες - κυτταρινολυτικά ένζυμα (cellulases),

Ονομάζεται ένα πολυσύνθετο ενζυμικό σύστημα που μπορεί να διασπάσει το πλέγμα της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης στα συστατικά τους μονομερή (γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη). Οι κυτταρινάσες παράγονται κυρίως από μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα. Η δομή των κυτταρινασών αποτελείται από δυο περιοχές, οι οποίες συνδέονται με ένα πεπτιδίο (linker), την α) καταλυτική περιοχή (Catalytic Domain, CD) και β) την περιοχή σύνδεσης (Cellulose Binding Domain, CBD) (Hildén & Johansson, 2004).



Εικόνα 1.24 (A) Η ενζυματική διάσπαση της κυτταρίνης περιλαμβάνει τη κοινή δράση εξωγλυκανασών (CBHs), ενδογλυκανάσες (EGs) και β -γλυκοσιδασών. **(B)** Η αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης περιλαμβάνει επίσης τη συνεργική δράση των διαφόρων ενζύμων και ενισχύει την ενεργότητα της κυτταρινάσης αυξάνοντας την προσπελάσιμη επιφάνεια κυτταρίνης.

1.7.5 Ενζυμική υδρόλυση υδατανθράκων για την παραγωγή σακχάρων

1.7.5.i Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

Τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά για την υδρόλυση της κυτταρίνης :

- **Ενδογλυκανάσες ή ένδο-1,4-β-D-γλυκάνο γλυκανοϋδρολάσες (endoglucanases, EGs):** είναι δραστικές έναντιάμορφης κυτταρίνης και διαλυτά παράγωγα κυτταρίνης όπως η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose, CMC).

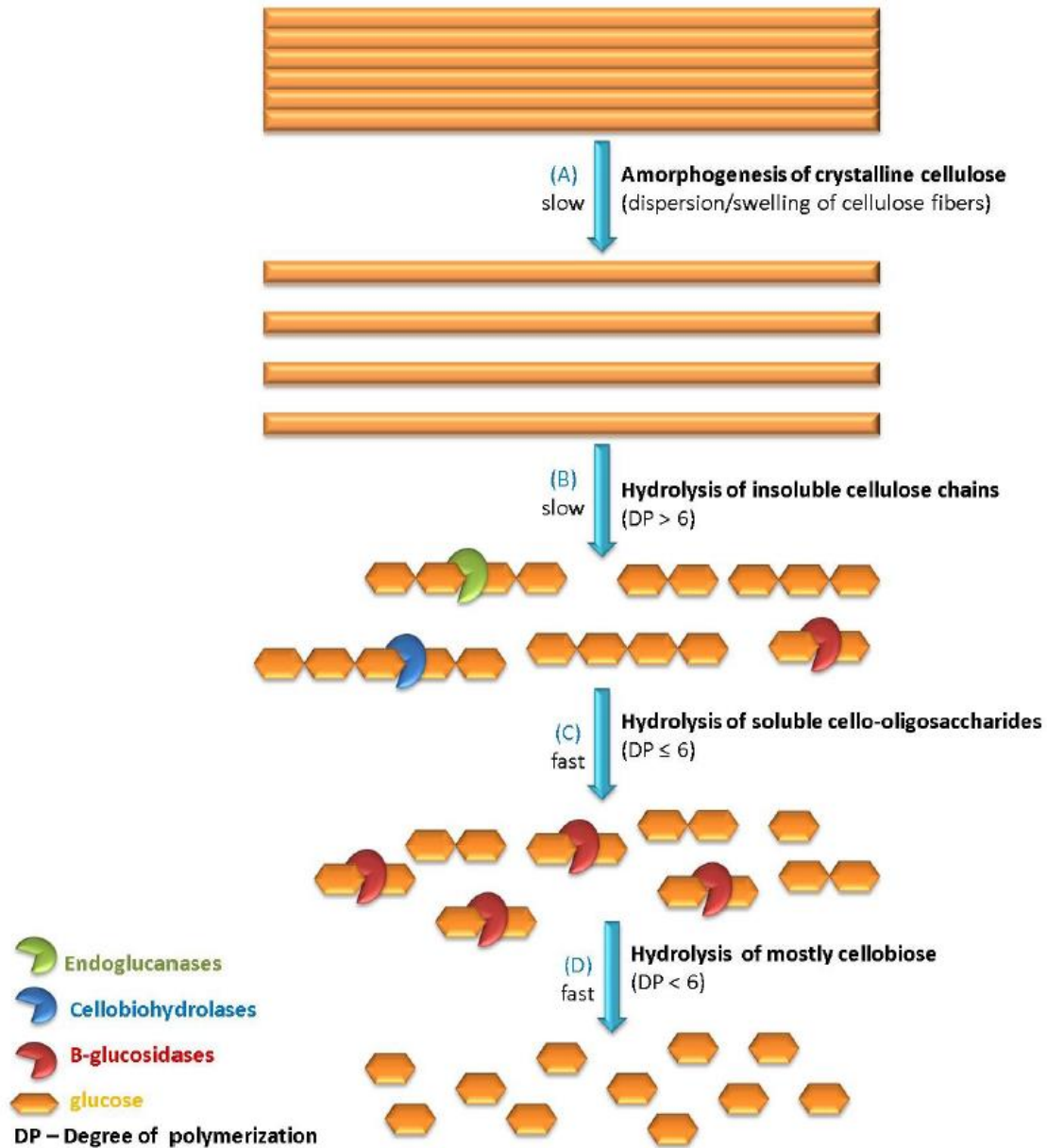
- **Εξωγλυκανάσες ή 1, 4-β-D- ολιγογλυκανο κελλοβιοϋδρολάσες (exoglucanases or cellobiohydrolases. CBHs):** Είναι γνωστές και ως κελλοδεξτρινάσες, και καταλύουν την παραγωγήκελλοβιόζης από κελλοολιγοσακχαρίτες (δηλαδή διαλυτά ολιγομερή της κυτταρίνης, όπως αυτά που παράγονται από τις ενδογλυκανάσες) αλλά δεν είναι δραστικές έναντι της άμορφης κυτταρίνης ή της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης

-**β-γλυκοσιδάσες ή β-D-γλυκοσιδο γλυκοϋδρολάσες:** Υδρολύουν την κελλεναλλαοβιόζη και τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες παράγοντας γλυκόζη, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι της κρυσταλλικής ή της άμορφης κυτταρίνης. Οι ενδογλυκανάσες δρουν τυχαία έναντι της άμορφης περιοχής τηςαλυσίδας της κυτταρίνης ώστε να παράγουν αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα για τις κελλοβιοϋδρολάσες, που καταλύουν την υδρόλυση της κελλοβιόζης από αναγωγικά ή μη αναγωγικά άκρα κρυσταλλικής κυτταρίνης. Οι αλυσίδες κυτταρίνης αποικοδομούνται έτσι αποδοτικά σε διαλυτή κελλοβιόζη και σε βιολογικούς σακχαρώδεις παράγοντες από την ενδο-εξω συνεργία των ενδο- και εξωγλυκανασών. Στο τελευταίο στάδιο της ενζυματικής αποικοδόμησης της κυτταρίνης, οι βιολογικοί κελλοολιγοσακχαρίτες υδρολύονται σε γλυκόζη με της δράση της β-γλυκοσιδάσης (Henrissat, 1985)

1.7.5.ii Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

Για την αποτελεσματική υδρόλυση και παραγωγή σακχάρων σε ένα λιγνινοκυτταρινούχο υλικό, είναι αναγκαία η υδρόλυση και της ημικυτταρίνης. Η ξυλάνη,

το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονιζάσες (α-glucuronidases), οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες (α-L-arabinofuranosidases), οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. (Arantes, 2010).



Εικόνα 1.25 Απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης κυτταρινασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης (Arantes, 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΌΡΓΑΝΑ

- Αέριος χρωματογράφος GC-17A, SHIMADZU (Ιαπωνία)
- Φωτόμετρο(SPECTRAmax 250 microplate reader, Molecular Devices, Η.Π.Α.).
- Φωτόμετρο του οίκου Hitachi UV 2000.
- Λουτρό υπερήχων
- Σύστημα παραγωγής υπερκάρου νερού Milli-Q ®, Direct-Q Integral Water Purification System for Ultrapure Water (Millipore, Η.Π.Α.).
- Φούρνος ξήρανσης
- Ξηραντήρας (silica gel)
- Θερμοστατούμενος περιστροφικός αναδευτήρας (Zhicheng 211C, Κίνα, LABLINE Incubator-Shaker, Η.Π.Α.)**
- Διάταξη διήθησης υπό κενό
- Συσκευή ανάδευσης Vortex
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί & Αναλυτικός ζυγός
- Μαγνητική συσκευή ανάδευσης – θέρμανσης, Orbit LS, Labnet (ΜεγάληΒρετανία)
- Φούρνος κενού
- Αυτόκαυστος Labo Autoclave του οίκου SANYO
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B.Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία). Freeze drying
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες.
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού
- Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC)
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μεγάλη Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία).
- Αναδευόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία).

2.2 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ – ΣΤΗΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (είτε HPLC-grade όταν ήταν απαραίτητο), όπου χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, προμηθεύτηκαν από τις παρακάτω εταιρίες: Sigma-Aldrich(Η.Π.Α.), AppliChem (Γερμανία), LAB-SCAN (Ιρλανδία), Panreac (Ισπανία), Fisher Scientific (Η.Π.Α.), Fluka(Ελβετία) και Carlo Erba (Γαλλία)

Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), ROTH (Η.Π.Α.), SIMAX(Τσεχία) και BOMEX(Κίνα).

2.3 ΈΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΧΗΜΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ (KITS)

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε από τη Biosis το Glucose GOD-POD Colorimetric Assay Kit.

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Cellic® CTec² της εταιρείας Novozymes (Δανία), το οποίο αποτελεί μίγμα κυτταρινασών. για την αποκοιδόμηση της κυτταρίνης προς ζυμώσιμα σάκχαρα. Συγκεκριμένα αποτελείται από ένα μίγμα με κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάσες. Η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου παρατηρείται σε θερμοκρασιακές περιοχές μεταξύ 45-50 °C και εύρος pH 5-5.5.

2.4 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (BUFFER SOLUTIONS) ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Τα ρυθμιστικά και λοιπά διαλύματα παρασκευάστηκαν με υπερκάθαρο νερό MilliQ ($R=18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$). Καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα (ΡΔ):

- ΡΔ οξικών (Acetate Buffer): 100mM, pH 6,5

Sodium Acetate (anhydrous) (MB: 82,03 g/mol), Glacial Acetic Acid (MB: 60,05 g/mol)

- ΡΔ φωσφορικών (Phosphate Buffer) : 50mM, pH 5

Potassium phosphate dibasic (MB: 174,18 g/mol), Potassium phosphate monobasic (MB: 136,09 g/mol)

- ΡΔ Τρις-Υδροχλωρικό (Tris-HCl Buffer) : 100mM, pH 6,7

Trizma (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) (MB: 121,04 g/mol), HCl

Οι απαραίτητες αποστειρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121°C, για 20 λεπτά, υπό πίεση.

2.5 ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Στέλεχος μικροοργανισμού:

Crypthecodinium cohnii ATCC® 30772™

- προσδιορισμός στελέχους: PGM-1
- απομόνωση: *Macrocystis sp.*, Pacific Grove, CA, 1977
- Παρελήφθη από την American Type Culture Collection (ATCC), καλλιεργήθηκε και διατηρήθηκε σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα.

Καλλιέργεια C. Cohnii

Growth Conditions Temperature: 20°C to 25°C

Culture System: Axenic Medium

ATCC® Medium 460: A2E6 medium (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ σελ. 105)

Προετοιμάστηκαν 50 mL υποστρώματος (ATCC Medium: 460 A2E6 Medium) σε Erlenmeyer φιάλες όπου και διατηρήθηκαν για 4 ημέρες στους 23 °C χωρίς ανακίνηση. Στο ίδιο μέσο (ATCC 460 Medium) διατηρήθηκε το απόθεμα του στελέχους για να μην υπάρξει εγκλιματισμός σε λιγότερα εμπλουτισμένο με θρεπτικά υπόστρωμα, που θα οδηγούσε σε αλλοίωση των βιολογικών χαρακτηριστικών της μικροάλης. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σαν εμβόλιο προκαλλιέργειας όγκου 50 mL σύστασης, 9 g/L γλυκόζη, 18.7 g/L θαλασσινό αλάτι και 2 g/L εκχύλισμα ζύμης. Ο όγκος του εμβολίου αποτελούσε το 10% του τελικού όγκου καλλιέργειας και το pH διατηρήθηκε στο 6.5. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν στο σκοτάδι για 3 ημέρες, σε θερμοκρασία 23 °C , χωρίς ανακίνηση και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σαν εμβόλιο όγκου 10% (v/v) σε ασυνεχής (batch) είτε ημιασυνεχής (fed-batch) καλλιέργεια, ανάλογα με το πείραμα που πραγματοποιείται την εκάστοτε χρονική στιγμή.

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ & ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.6.1 Υπολογισμός συγκέντρωσης γλυκόζης μέσω της μεθόδου (GOD) – (POD)

Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης με τη χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (Biosis kit). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος, το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Παρουσία του ενζύμου γλυκόζο οξειδάση (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂. Η αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂ με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν. Τα δείγματα προς ανάλυση παραμένουν στους 37 °C για 15 λεπτά. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη βοήθεια microplate reader. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, με χρήση αντίστοιχων αντιδράσεων ελέγχου (control). Η απελευθέρωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης ή της ξυλόζης ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος.

Αρχή Μεθόδου

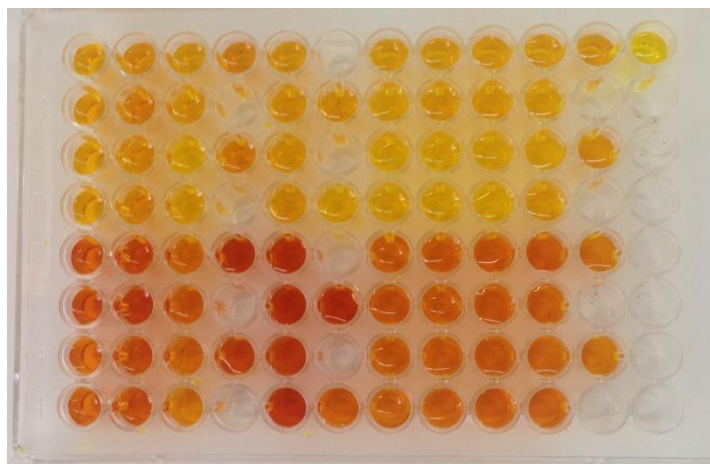


2.6.2 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ). Η μέθοδος αναπτύχθηκε αρχικά από τον Sumner και τους συνεργάτες του και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Miller (1959). Το χρώμα που παρατηρείται στα δείγματα, είναι λόγω αναγωγής του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος, σε 3,5-αμινονιτροσαλικυλικό οξύ από τις αλδεύδες που βρίσκονται στα αναγωγικά σάκχαρα. Ωστόσο διαφορετικά σάκχαρα δίνουν διαφορετικές απορροφήσεις που μας προϊδεάζει ότι η χημεία που συνοδεύει την αντίδραση είναι πιο περίπλοκη. Από την ανάλυση λιγνινοκυτταρινικών, μπορούν να προσδιοριστούν μονοσακχαράιτες, δισακχαρίτες, ένα εύρος διαλυτών ολιγομερών αλλά και άλλες ουσίες που απελευθερώθηκαν κατά την υδρόλυση, και θα δώσουν χρώμα όταν έρθουν σε επαφή με το DNS αντιδραστήριο. (Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates Warwick L. Marsden, Peter P. Gray, Greg J. Nippard and Mark R. Quinlan).

Διαδικασία μεθόδου

Προστίθενται 250 μL αντιδραστηρίου DNS σε 250 μL του δείγματος, εντός γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα, ο οποίος τοποθετείται σε νερό που βράζει για διάστημα 5 λεπτών. Αμέσως μετά το πέρας του βρασμού, εισάγεται 2 mL υπερκάθαρου νερού ανακινείται και το δείγμα είναι έτοιμο για την κυψελίδα του φωτόμετρο, όπου και υπολογίζεται η απορρόφηση από το φωτόμετρο με ακτίνα φωτός μήκους κύματος ίση με 540 nm. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, με χρήση αντίστοιχων αντιδράσεων ελέγχου (control) με απενεργοποιημένο ένζυμο. Η απελευθέρωση των αναγωγικών



Εικόνα 2.1 Δείγματα προς ανάλυση DNS σε microplate

σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης ή της ξυλόζης ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος.

2.6.3 Αέριος χρωματογράφος (GC)

Αέριος χρωματογράφος (**GC-17A, SHIMADZU, Ιαπωνία**) με στήλη Agilent J&W HP-5 Intuno GC column. χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των παραγόμενων λιπαρών, από την καλλιέργεια του μικροφύκου. Η επιλογή του φέροντος αερίου (κινητή φάση) ήταν το αέριο ήλιον (He) με ρυθμό 1 mL/min και η ένεση πραγματοποιούνταν στους 270 °C βαθμούς. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 125 °C και με μία αύξηση 5 °C /min, οδηγούταν στη τελική των 240 °C. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) και ο χρόνος ανάλυσης των δειγμάτων ρυθμίστηκε στα 34 λεπτά. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και με τη χρήση εσωτερικών προτύπων ταυτοποιήθηκαν τα παραγόμενα λιπαρά, οι χρόνοι συγκράτησης, (t_R retention time) αλλά και οι συντελεστές διόρθωσης που αντιστοιχούν για την ποσοτική ανάλυση.



Εικόνα 2.2 Αέριος χρωματογράφος GC-17A, SHIMADZU (Ιαπωνία)

2.6.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC)

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC), χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των μομοερών σακχάρων, μέσω στήλης της Aminex HPX-87H με Cation-H Bio-Rad micro-guard column στους 50°C (Bio-Rad Laboratories) και κινητή (αντίστροφη) φάση θειικού οξέος of 0.3 g/L με ρυθμό παροχής στα 0.6 mL/min. Ο χρόνος ανάλυσης του κάθε δείγματος ήταν 40 λεπτά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης και της ξυλόζης πραγματοποιήθηκε μέσω των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 5.1.3)



Εικόνα 2.3 Σύστημα χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC)

2.6.5 Απομόνωση λιπαρών από λυοφιλιωμένη βιομάζα καλλιέργειας κυττάρων

Προστέθηκαν 10 mL οργανικού διαλύματος χλωροφόρμιο CHCl_3 - μεθανόλη CH_3OH αναλογίας 2:1 (v/v), σε 50 mg κονιοροτοποιημένης, λυοφιλιωμένης και αφαιρωμένης βιομάζας, και αφότου ανακινήθηκαν με τη χρήση ρυθμιζόμενου αναδευτήρα σωληναρίων (vortex), παρέμειναν σε κλειστά γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης για 24 ώρες. Οποιαδήποτε κροκιδώματα και συσσωματώματα εξαλείφθηκαν σε λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια προστέθηκε 2 mL υπερκάθαρου νερού milliQ σε κάθε δείγμα, και ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε έκπλυση με ισοτονικό διάλυμα και στη συνέχεια δεύτερη φυγοκέντριση. Μεταφέρθηκε η

κάτω φάση με τη χρήση σύριγγας σε διαχωριστική φιάλη (όγκου 250 mL), και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με 1 mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης CH₃OH 50% (v/v). Η κάτω φάση συλλέχθηκε σε νέα διαχωριστική φιάλη (όγκου 250 mL), όπου και πραγματοποιήθηκε δεύτερη εκχύλιση, όμοια της πρώτης. Επιπροσθέτως η κάτω φάση (λιπαρά - διαλύτης) συλλέχθηκε σε γυάλινους σωλήνες, καλυμμένους με αλουμινόχαρτο (για την προστασία τους από UV-Vis ακτινοβολία, όπου θα οδηγούσε σε αύξημένο ρυθμό οξείδωσης των λιπαρών) , τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού με ρυθμισμένη θερμοκρασία 41 °C και πίεση 457 mbar , όπως και απομακρύνθηκε ο διαλύτης.

2.6.6 Προετοιμασία μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων , (Fatty Acid Methyl Esters FAMES) προς ανάλυση

Για να επιτευχθεί η ανάλυση των απομονωμένων λιπαρών, απαιτήθηκε η μετατροπή τους σε μεθυλέστερική μορφή. Αρχικά, επαναιωρήθηκαν εντός των γυάλινων σωληνίων, σε 1 mL χλωροφορμίου CHCl₃ με τη χρήση ρυθμιζόμενου αναδευτήρα σωληναρίων (vortex). Προστέθηκαν 2.5 mL διαλύματος μεθανόλης CH₃OH 92% (v/v) & υδροχλωρικού οξέος HCl (37%) 8% (v/v) , και παρέμειναν σκεπασμένα με αλουμινόχαρτο για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C, όπου και λαμβάνει μέρος η αντίδραση. Στη συνέχεια, αναστέλλεται η αντίδραση με την προσθήκη ιοντικού υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου, CaCl₂ 5% (w/v). Επιτελικά, με τη χρήση 1mL οργανικού διαλύτη (εξάνιο C₆H₁₄ HPLC Grade) πραγματοποιείται εκχύλιση 4 φορές , όπου και απομακρύνεται και συλλέγεται η πάνω φάση, με πουάρ όγκου 1mL και πιπέττα Pasteur χωρητικότητας 2mL. Τα δείγματα φυλάσσονται σε πλαστικά δοχεία (falcon tubes) όγκου 20 mL εντός κατάψυξης, σε θερμοκρασία -20 °C.

2.7 ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

- Οι αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (GC-17A SHIMADZU, Ιαπωνία) πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα **CLASS-VP Chromatography Data system VP4.3a**
- Για τη μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας στο φωτόμετρο (SPECTRAmax 250 microplate reader, Molecular Devices, Η.Π.Α.) χρησιμοποιήθηκε το **Softmax Pro version 1.1**
- Για τις αναλύσεις της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **LC solution (Shimadzu)**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

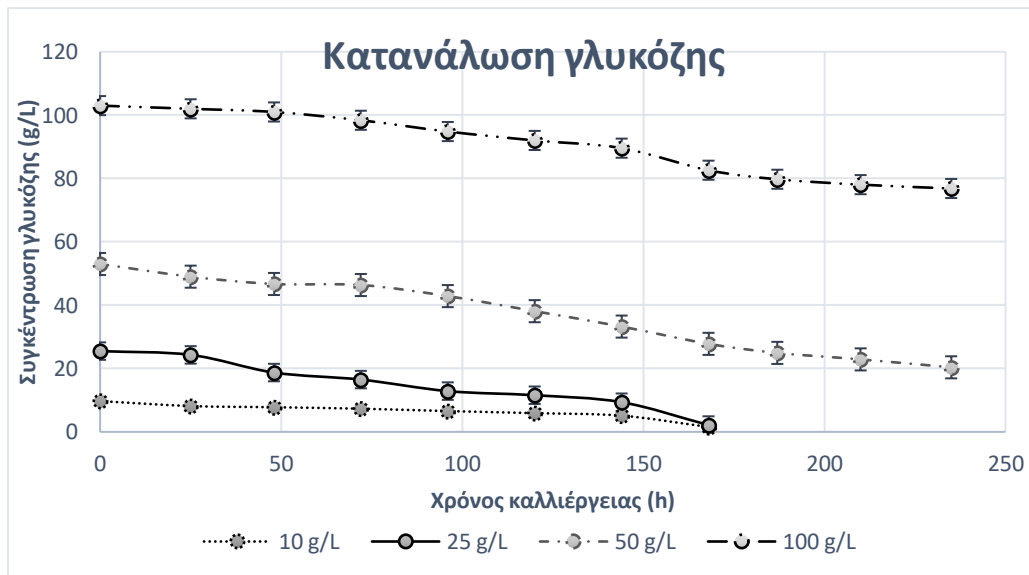
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα αναδευόμενων φιαλών, σε όγκο 40 mL, όπου προστέθηκε 10% του όγκου εμβόλιο. Το αρχικό pH της καλλιέργειας ρυθμίστηκε στο 6.5 και οι συνθήκες της καλλιέργειας ήταν 27°C και 160 rpm, οι οποίες είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη του μικροφύκου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Bean & Holz, 1973; Ishida, 1968; Swaaf, 2003). Εκχύλισμα ζύμης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου (αναλογία εκχυλίσματος - πηγή άνθρακα 1 προς 10-15 (Kyle et al. 1997)), ενώ σε όλες τις καλλιέργειες προστέθηκε διάλυμα μεταλλικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και βιταμινών (sea salts) σε συγκέντρωση 25 g/L, σύμφωνα με τα ευρήματα των ISLETEN et. al (2015) και Swaaf (1999), όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων για τιμές αλατότητας μεταξύ 16.0-29.45 g/L. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε υδρόλυμα στερεής πούλπας προκατεργασμένης βιομάζας ως πηγή άνθρακα, αρχικά πραγματοποιήθηκε υδρόλυση προς την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων με τη βοήθεια του εμπορικού παρασκευάσματος Cellic® CTec2 (Novozymes) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών αλάτων (pH 5.0) και 72 ώρες επώασης στους 50°C, σε περιοχές δηλαδή που παρατηρείται η μέγιστη απόδοση του ενζύμου (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Εικόνα 5.3) Τέλος, τα στοιχεία προκατεργασίας και η σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, υπάρχουν στα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ (βλ. Εικόνα 5.1 & Εικόνα 5.2).

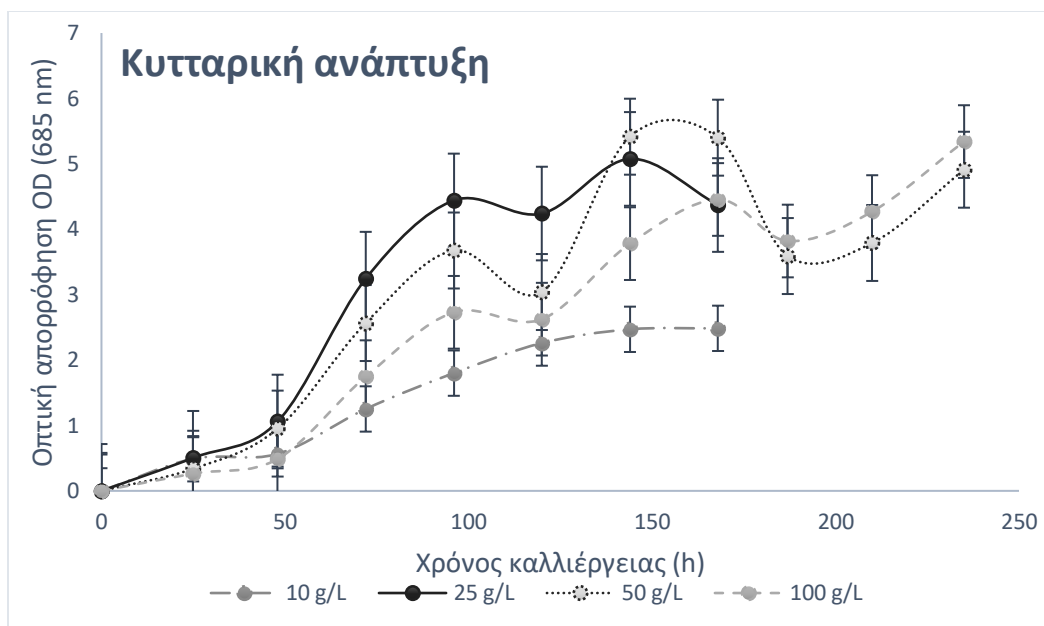
3.1.1 Κυτταρική ανάπτυξη και συσσώρευση λιπιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και παρουσία φαινολικών χαρακτηριστικών ομάδων

Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη και η συσσώρευση λιπαρών οξέων που λαμβάνει μέρος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (25, 50 και 100 g/L). Στο συγκεκριμένο πείραμα η γλυκόζη αποτέλεσε και την μοναδική καθαρή πηγή άνθρακα.

Ακόμα, μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών χαρακτηριστικών ομάδων, στην ανάπτυξη της καλλιέργειας. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα άνθρακα, σε ξεχωριστές καλλιέργειες, το φερουλικό οξύ ($C_{10}H_{10}O_4$) και η γουαϊακόλη ($C_6H_4(OH)(OCH_3)$).

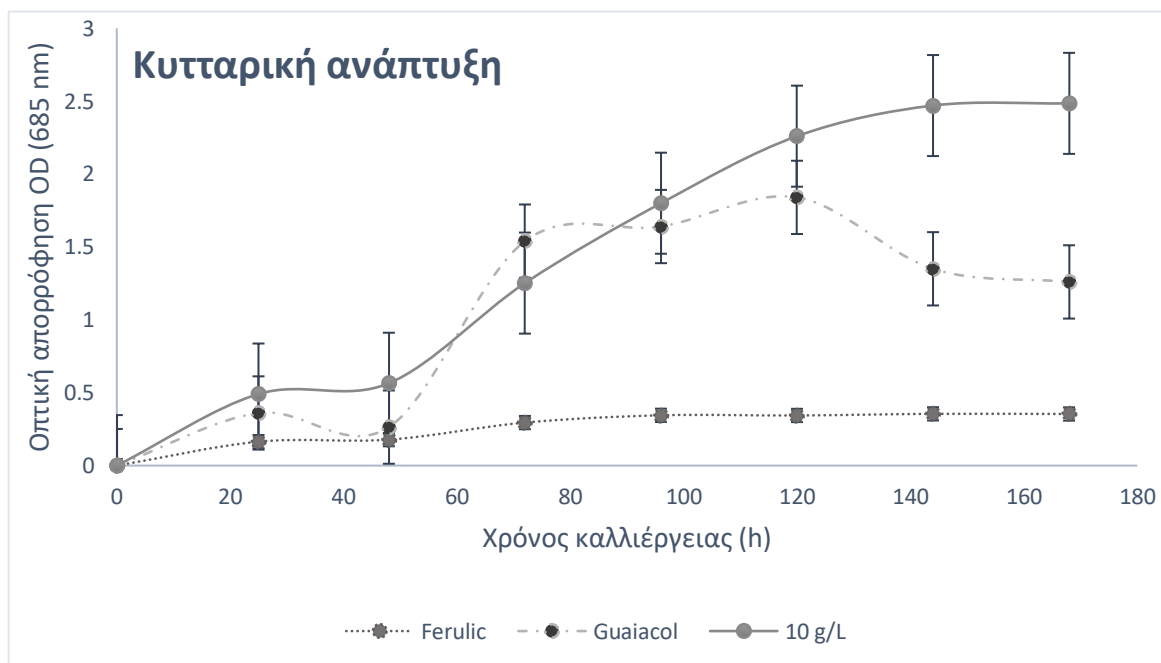


Διάγραμμα 3-1 Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων

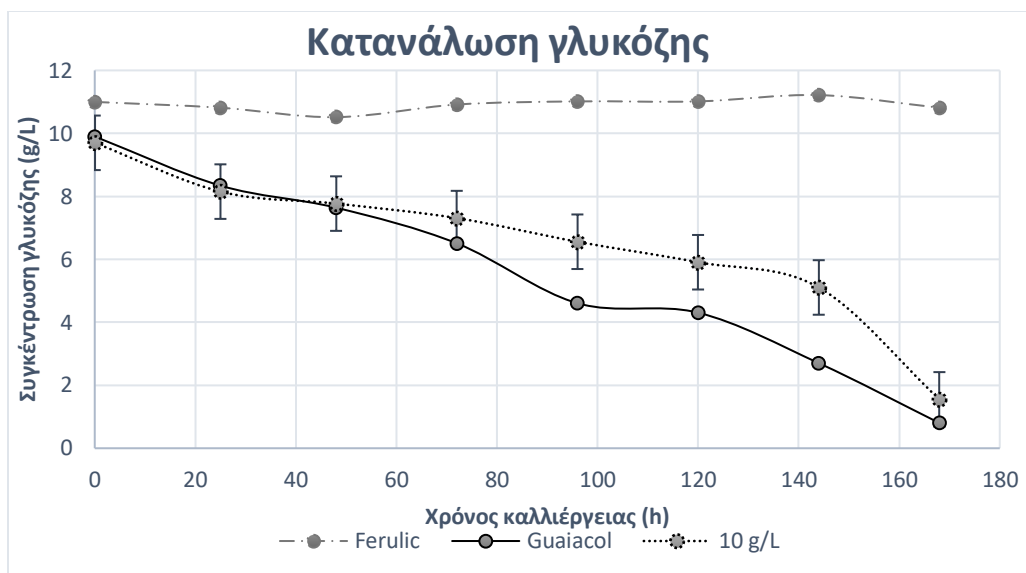


Διάγραμμα 3-2 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειες διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης

*Καλλιέργειες που επώαστηκαν για 72 παραπάνω ώρες



Διάγραμμα 3-3 Κυτταρική ανάπτυξη καλλιεργειών με καθαρή πηγή γλυκόζης και παρουσία φαινολικών



Διάγραμμα 3-4 Κατανάλωση γλυκόζης σε καλλιέργειες με καθαρή πηγή γλυκόζης και παρουσία φαινολικών χαρακτηριστικών ομάδων

Πίνακας 3.1 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων

Ορεπτικό μέσο	Συγκέντρωση	Βιομάζα	Λιπαρά οξέα	Λιπαρά οξέα	Λιπαρά οξέα/	Λιπαρά οξέα/	DHA %
	θρεπτικού (g/L)	(g/L)	(g/L)	(% ξ.β. Βιομάζας)	καταναλωμένη βιομάζα (mg/g)	καταναλωμένη γλυκόζη (mg/g)	
Γουαιακόλη	10	3.18 ± 0.1	0.71 ± 0.02	22.40	224.00	3.13	46.60 ± 1
		4.21 ± 0.08	0.69 ± 0.23	16.40	164.00	3.39	44 ± 1.3
Γλυκόζη	25	9.51 ± 0.07	2.02 ± 0.03	21.30	213.00	3.66	44.5 ± 2.4
	50*	11.96 ± 0.4	3.43 ± 0.11	28.67	286.67	4.20	43.2 ± 3.7
	100*	12.39 ± 0.5	3.61 ± 0.13	29.20	292.00	5.53	42.3 ± 2.9

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε καθυστέρηση της κυτταρικής ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, με βέλτιστο εύρος τιμών να κυμαίνεται μεταξύ 20-35 g/L, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Jiang & Chen 2000a). De Swaaf et al. (1999).

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η περίσσεια παρουσία άνθρακα σε συνδυασμό με τον περιορισμό της ποσότητας αζώτου στην καλλιέργεια, αυξάνει την λιπογένεση (Πίνακας 3.1) (Pleissner 2012), (Chen & Johns 1991) χωρίς όμως να αλλάζει το προφίλ των παραγόμενων λιπαρών οξέων, και το ποσοστό σχηματισμού DHA έναντι των υπόλοιπων λιπαρών. Ειδικότερα, παρατηρείται μειωμένη συσσώρευση λιπαρών κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, ενώ αυξάνει κατά τη γραμμική ανάπτυξη, λόγω

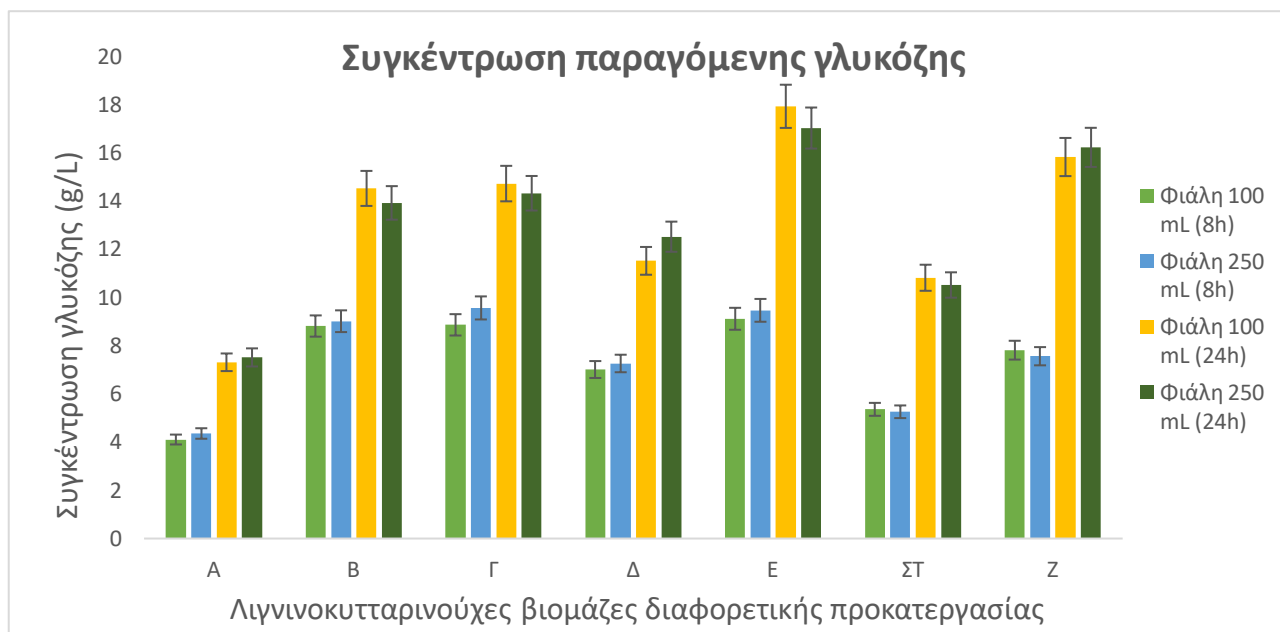
περιορισμού κάποιου θρεπτικού, που επηρεάζει τον μεταβολισμό του μικροφύκου. de Swaaf et al. (2003b, c)

Είναι πολύ σημαντικό λοιπόν να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα η συγκέντρωση του άνθρακα, καθ' όλη τη διάρκεια της λιπογένεσης, τόσο για να ξεκινήσει η μεταβολική παραγωγή των λιπιδίων, αλλά και για να μην καταναλωθούν από τον ίδιο τον μικροοργανισμό τα ήδη σχηματισμένα λιπαρά (Wynn et al. 2005; (Chen & Johns 1991).

Το φερουλικό οξύ δεν αποτελεί καλή πηγή άνθρακα καθ' ότι η καλλιέργεια αναπτύχθηκε ελάχιστα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο. Αντίθετα, η γουαϊακόλη δεν λειτούργησε παρεμποδιστικά και η καλλιέργεια είχε παρόμοια ανάπτυξη και συσσώρευση λιπαρών, όπως στην περίπτωση της γλυκόζης. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι οι φαινολικές χαρακτηριστικές ομάδες δε λειτουργούν απαραίτητως παρεμποδιστικά για την ανάπτυξη του *C.conhii*.

3.1.2 Μελέτη της επίδρασης του όγκου φιάλης και της αλατότητας, στην απόδοση υδρολυτικής ικανότητας κυτταρινασών

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση που μπορεί να έχει ο όγκος της φιάλης, και κατά συνέπεια της καλλιέργειας στην υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων βιομαζών. Με αυτό το τρόπο μπορεί να κριθεί ως επιτρεπτή ή όχι, η ασφαλής μετάβαση συμπερασμάτων μεταξύ υδρολύσεων διαφορετικής κλίμακας. Επιλέχθηκαν φιάλες όγκου 100 και 250 mL, με το ενζυμικό διάλυμα να καταλαμβάνει το 10% του όγκου (10 και 25 mL αντίστοιχα), 9% (β/β) ξηρής βιομάζας και ενζυμικό φορτίο 9 mg/g. Τα στοιχεία και η σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών (A-Z) που χρησιμοποιήθηκαν, υπάρχουν στα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Εικόνα 5.2 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Cryptocodium conhii* Εικόνα 5.2.

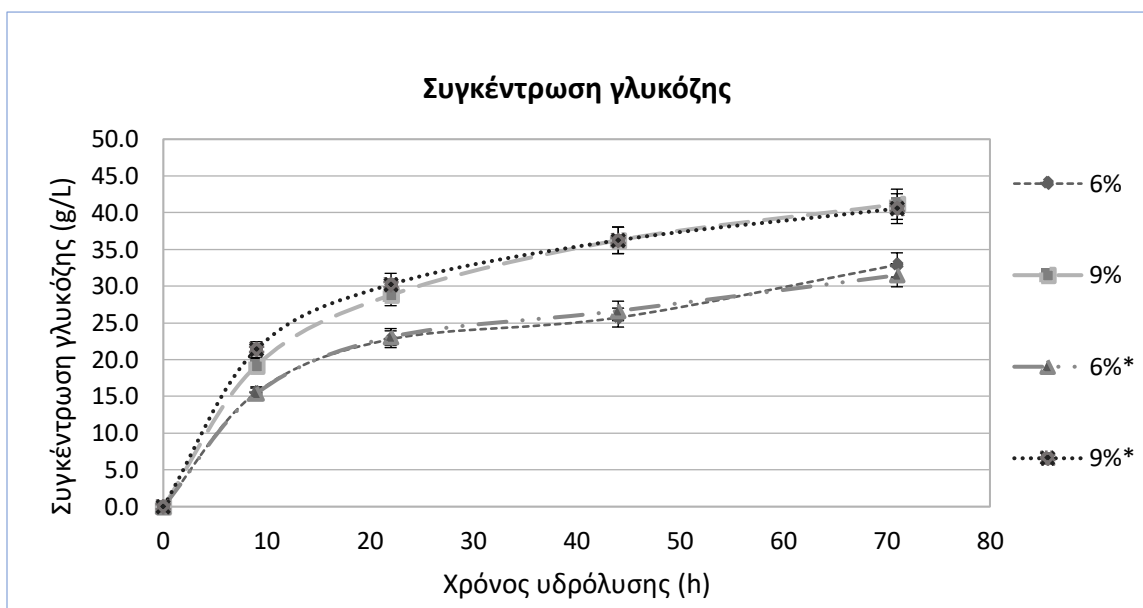


Διάγραμμα 3-5 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης από φιάλες διαφορετικού όγκου

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα, η απόδοση της υδρόλυσης δεν επηρεάζεται από τον όγκο της φιάλης στην οποία πραγματοποιείται, όσο παραμένουν αμετάβλητες οι υπόλοιπες μεταβλητές. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι βιομάζες E και Z, παρήγαγαν τα περισσότερα σάκχαρα γλυκόζης, στον ίδιο όγκο ενζυμικού διαλύματος.

Ακόμα, ερευνήθηκε η επίδραση της αλατότητας της καλλιέργειας (25 g/L), πάνω στην δράση του ενζύμου. Η λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε είναι η “SE5: Corn Stover”, προϊόν προκατεργασίας με έκρηξη ατμού (νερό με 1% H₂SO₄) και με τελική σύσταση 45% w/w κυτταρίνη και 21% w/w ημικυτταρίνη. Η έκρηξη ατμού είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινικών υλικών (McMillan, 1994.). Στη μέθοδο αυτή, η βιομάζα επεξεργάζεται με κορεσμένο ατμό υψηλής πίεσης και στη συνέχεια η πίεση ξαφνικά μειώνεται, πράγμα που κάνει τα υλικά να υποβάλλονται σε εκρηκτική αποσυμπύεση. Η έκρηξη ατμού ξεκινά τυπικά σε θερμοκρασία 160-260 ° C (πίεση, 0,69-4,83 MPa) για μερικά δευτερόλεπτα ως λίγα λεπτά πριν από την έκθεση του υλικού σε ατμοσφαιρική πίεση (Sun, 2002). Η διαδικασία προκαλεί την αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και το μετασχηματισμό της λιγνίνης λόγω υψηλών θερμοκρασιών, αυξάνοντας έτσι την απόδοση υδρόλυσης της κυτταρίνης.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά ποσοστά (6 και 9%) (w/w) ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 3-6 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης παρουσία και απουσία άλατος

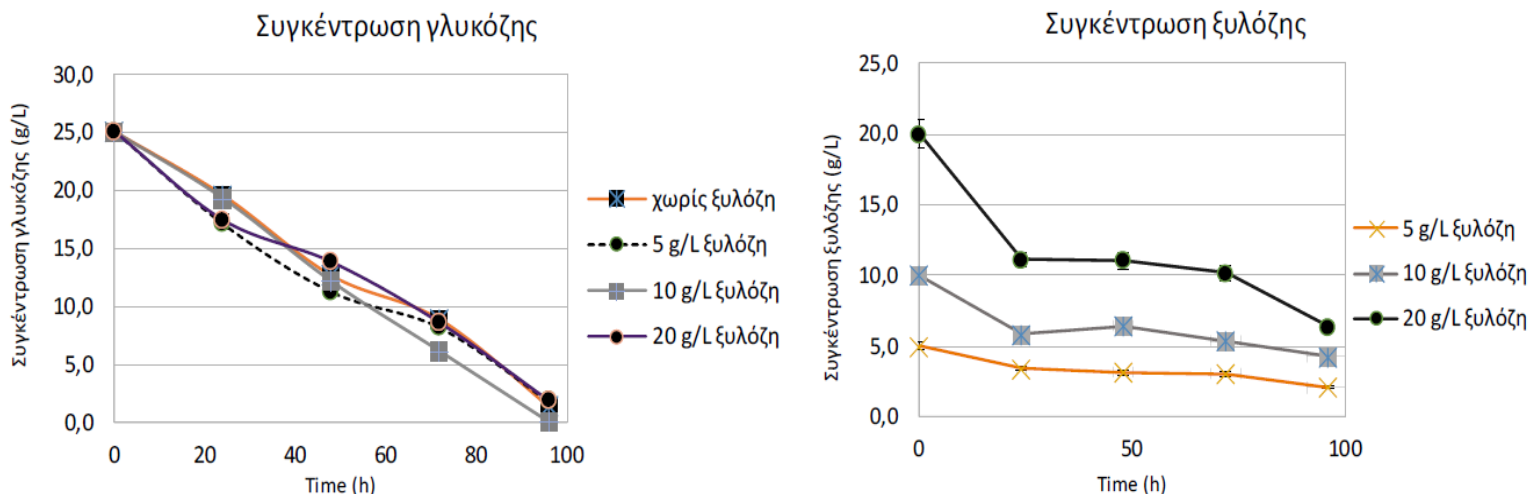
*Φιάλη με αλατότητα 25 g/L

Όπως προέκυψε, η παρουσία θαλασσινού αλατιού συγκέντρωσης 25 g/L, στο ενζυμικό διάλυμα, δεν προκαλεί αρνητικές ή θετικές επιπτώσεις στην απόδοση της υδρόλυσης, ενώ η παραπάνω ποσότητα ξηρής βιομάζας (9%) απελευθέρωσε, όπως αναμενόταν, παραπάνω μόρια γλυκόζης στον ίδιο όγκο.

3.1.3 Μελέτη καλλιέργειας σε σύστημα ανακινούμενων φιαλών παρουσία διαφορετικών αναλογιών γλυκόζης – ξυλόζης (%)

Μελετήθηκε η δυνατότητα του *C. cohnii* να καταβολίζει πεντόζες και ιδιαίτερα την ξυλόζη, το οποίο αποτελεί ένα χαρακτηριστικό ιδιαίτερης σημασίας, εφόσον αυτό το σάκχαρο βρίσκεται στο υδρόλυμα της βιομάζας. Συνεπώς, έπρεπε να διασαφηνιστεί αν είναι εφικτή η βιο-μετατροπή του από το μικροφύκος, αλλά και αν λειτουργεί

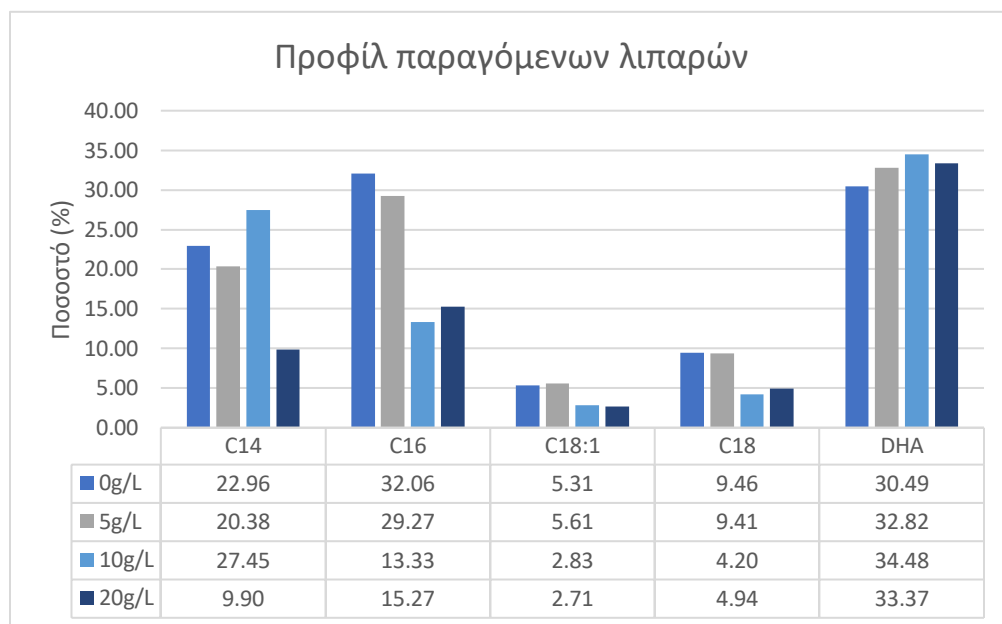
παρεμποδιστικά για την ανάπτυξη της καλλιέργειας και τη λιπογένεση. Ερευνήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκου παρουσία συνδυασμού γλυκόζης και ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, όπου η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν ίση με 25 g/L, ενώ η ξυλόζη προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 5 – 20 g/L.



Διάγραμμα 3-7 Κατανάλωση γλυκόζης και ξυλόζης, όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται παρουσία διαφορετικών συνδυασμών των δυο σακχάρων ως πηγή άνθρακα. Το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στο 6.7-7.2 για τις 100 ώρες της επώασης.

Πίνακας 3.2 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων παρουσία συνδυασμού γλυκόζης και ξυλόζης ως πηγή άνθρακα. Σε όλα τα πειράματα, ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 100 ώρες, ενώ η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν ίση με 25 g/L και η συγκέντρωση πηγής αζώτου ίση με 2 g/L.

Ξυλόζη (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Λιπαρά οξέα (g/L)	Λιπαρά οξέα (% ξ.β. κυττάρων)	DHA (g/L)	DHA % (% ξ.β. λιπαρών οξέων)
0	7.42 ± 0.09	3.46 ± 0.05	46.7 ± 2.5	1.06 ± 0.05	30.49 ± 0.29
5	7.31 ± 0.29	3.37 ± 0.01	46.1 ± 0.3	1.11 ± 0.03	32.82 ± 2.5
10	9.03 ± 0.93	3.82 ± 0.11	42.3 ± 0.1	1.32 ± 0.06	34.48 ± 1.48
20	7.37 ± 0.55	3.11 ± 0.02	42.2 ± 0.2	1.04 ± 0.02	33.37 ± 1.57



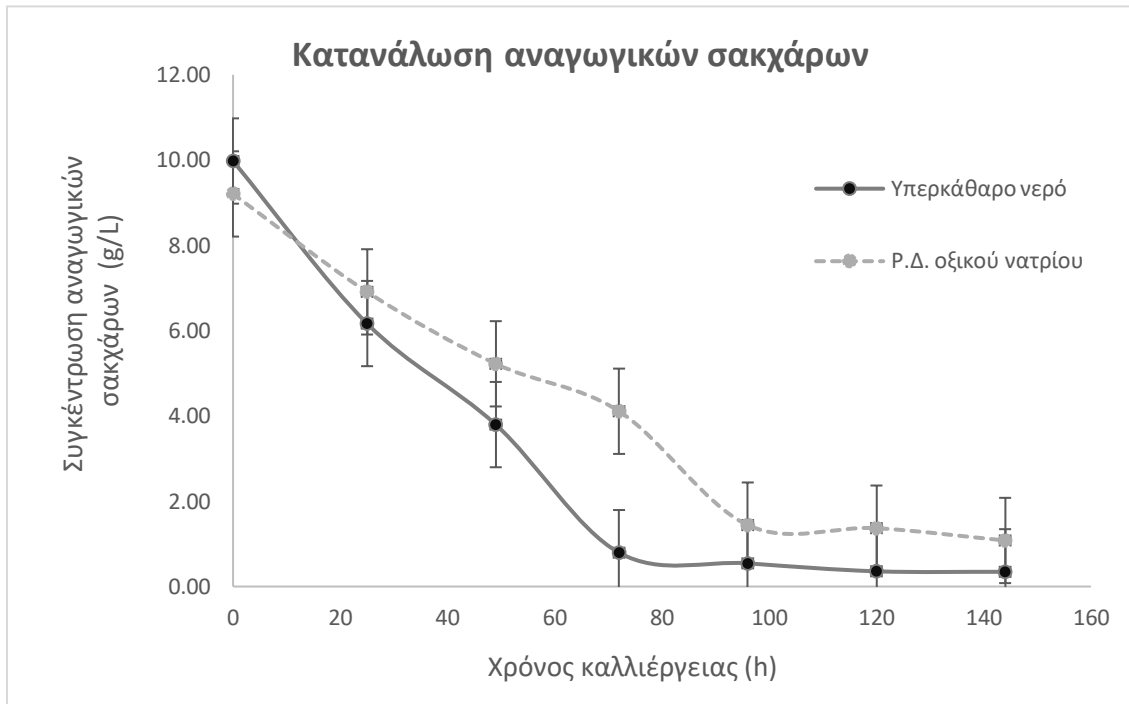
Διάγραμμα 3-8 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών, όταν το μικροφύκος αναπτύσσεται παρουσία διαφορετικών συνδυασμών των δυο σακχάρων ως πηγή άνθρακα. Το pH της καλλιέργειας διατηρήθηκε σταθερό στο 6.7-7.2 για τις 100 ώρες της επώασης.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2** και στο Διάγραμμα 3-7, όπου φαίνεται πως η παρουσία της ξυλόζης δεν επηρεάζει το ρυθμό με τον οποίο καταναλώνεται η γλυκόζη, ενώ η κατανάλωση πεντοζών και εξοζών μπορεί να γίνει ταυτόχρονα από το μεταβολισμό του μικροφύκου. Επίσης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη της βιομάζας και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων στα κύτταρα, η οποία φτάνει ως και 46.7% του ξ.β. βιομάζας (**Πίνακας 3.2**). Τα ποσοστά συσσώρευσης του DHA επίσης παραμένουν όμοια για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ξυλόζης και φτάνουν το 34.5% του συνολικού ξ.β. των λιπαρών οξέων. Τέλος, σύμφωνα με το

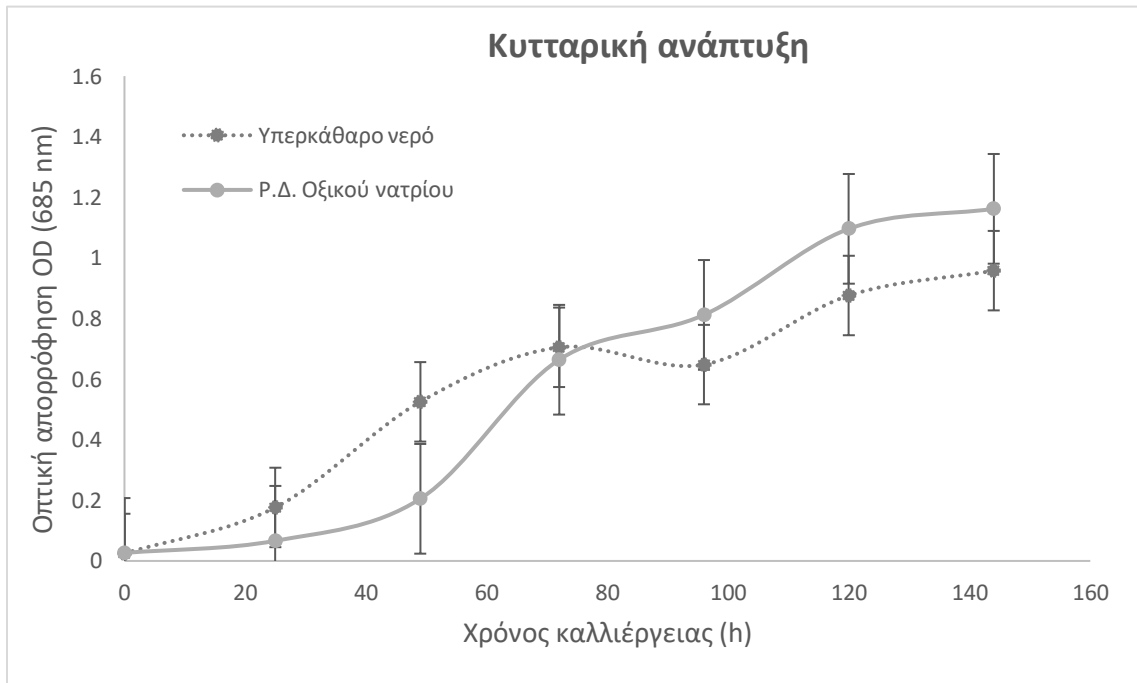
Διάγραμμα **3-8**, φαίνεται ότι η παρουσία ξυλόζης αναστέλλει το μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης του παλμιτικού οξέος C16:0.

3.1.4 Μελέτη για ξυλόζη, ρυθμιστικό διάλυμα και για συνθήκες καλλιέργειας με pH: 5.5 σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών

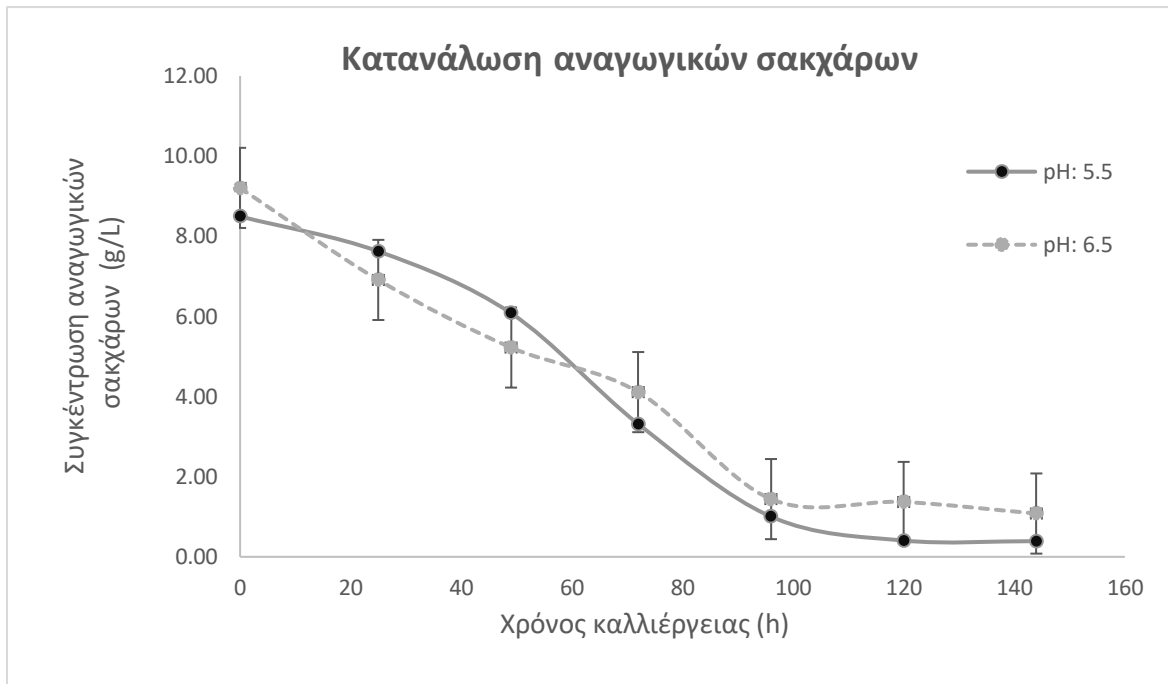
Πραγματοποιήθηκε επαναληπτικό πείραμα για να συγκριθεί η ξυλόζη και η γλυκόζη ως υποστρώματα άνθρακα, αλλά και η δυνατότητα της καλλιέργειας να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο υπερκάθαρου νερού, χωρίς την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος. Στις άλλες φιάλες προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (100mM). Διατηρήθηκε σταθερή η συνολική ποσότητα των δύο επιλεγμένων αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζη, ξυλόζη) στα 25 g/L με μεταβαλλόμενη τη σχετική τους αναλογία (100, 80 και 50% κατά βάρος, ως προς τη γλυκόζη). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκου σε όξινες συνθήκες (pH 5.5), χαμηλότερα και εκτός δηλαδή του εύρους 6-7, όπου στην υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρεται ως το βέλτιστο. Η ανάπτυξη του μικροφύκου σε πιο όξινες συνθήκες, μπορεί να αφαιρέσει ή να ελαχιστοποιήσει το στάδιο ρυθμίσεως του pH, που λαμβάνει μέρος μεταξύ υδρόλυσης και καλλιέργειας, διότι κατά την υδρόλυση για τιμές pH > 6, η απόδοση του ενζύμου μειώνεται κατά τουλάχιστον 20% από τη μέγιστη (βλέπε ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Εικόνα 5.3).



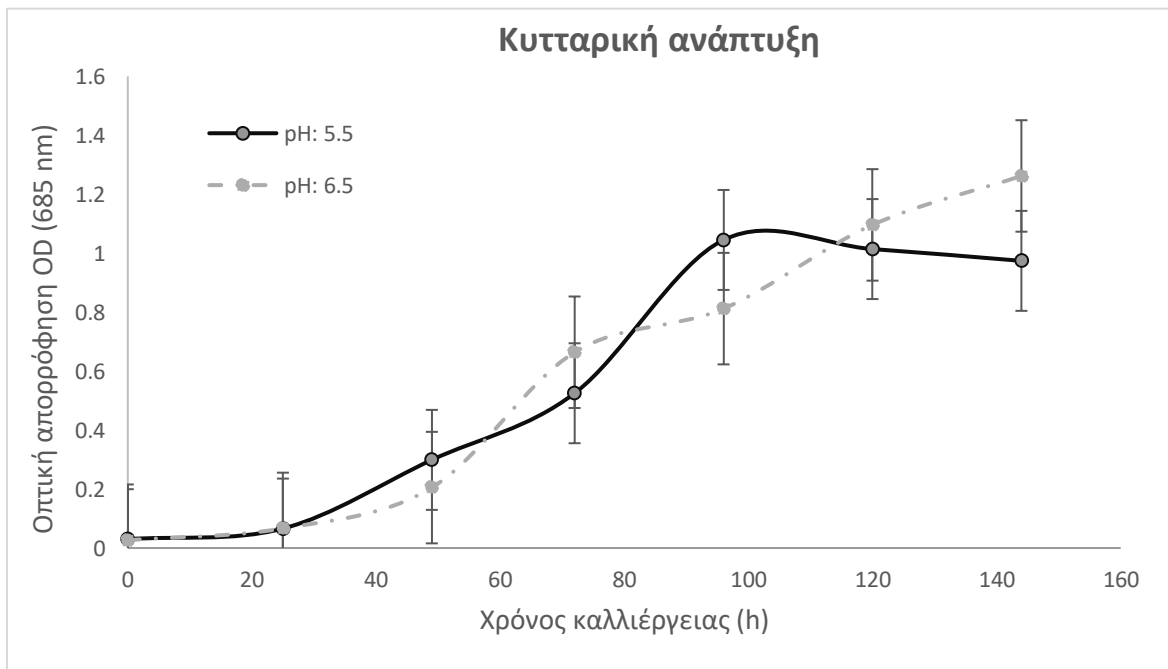
Διάγραμμα 3-9 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων παρουσία υπερκάθαρου νερού και οξικού οξέος



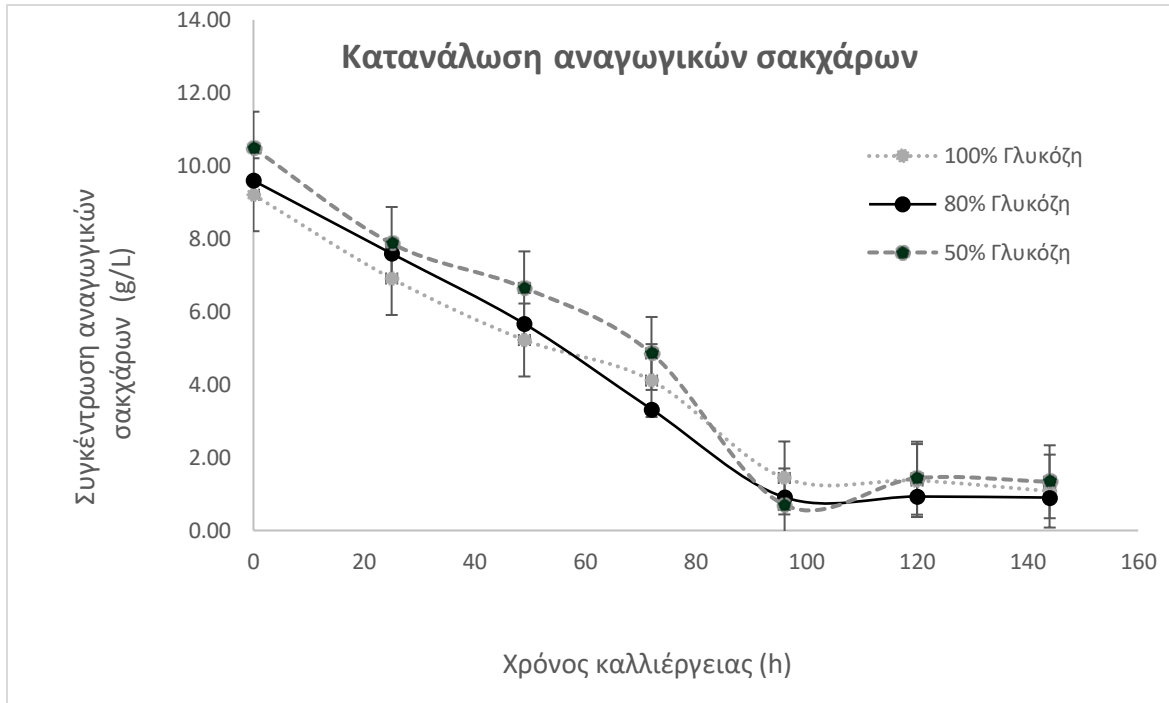
Διάγραμμα 3-10 Κυτταρική ανάπτυξη παρουσία υπερκάθαρου νερού και οξικού οξέος



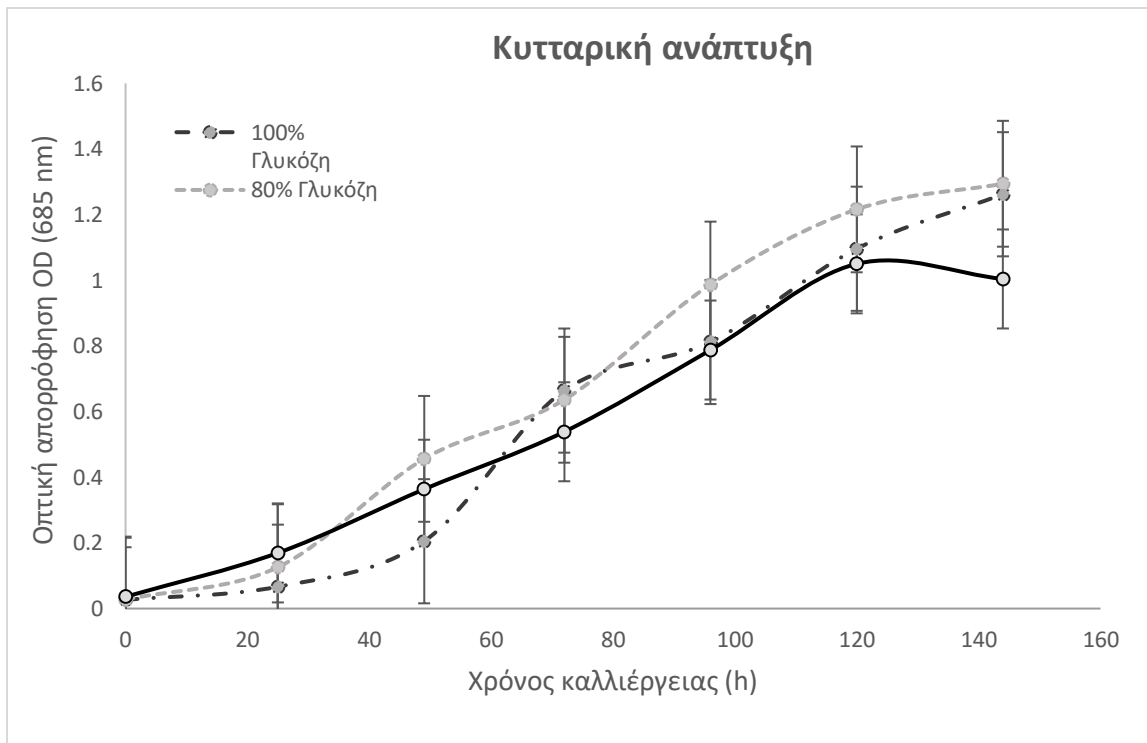
Διάγραμμα 3-11 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων σε καλλιέργειές με αρχικές τιμές pH:5.5 και 6.5



Διάγραμμα 3-12 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειές με αρχικές τιμές pH:5.5 και 6.5



Διάγραμμα 3-14 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων σε καλλιέργειές με διαφορετική αναλογία γλυκόζης – ξυλόζης (%)



Διάγραμμα 3-13 Κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργειές με διαφορετική αναλογία γλυκόζης – ξυλόζης (%)

Πίνακας 3.3 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων

Γλυκόζη-Ξυλόζη (%)	Θρεπτικό μέσο	pH	Ξηρό βάρος κυττάρων	Λιπαρά οξέα	Λιπαρά οξέα
			(mg)	(% ξ.β. κυττάρων)	(g/L)
100 - 0	Υπερκάθαρο νερό	6.5	113 ± 9	35.4 ± 2.5	0.80
	Οξικό νάτριο (100 mM)	5.5	114 ± 4	26.7 ± 0.2	0.67
6.5		128 ± 2	23.4 ± 1.2	0.68	
		138 ± 7	22.2 ± 0.6	0.64	
50 - 50		6.5	138 ± 1	19.9 ± 0.3	0.55

Διαπιστώθηκε ότι το οξικό νάτριο δεν αποτέλεσε καλή επιλογή ρυθμιστικού διαλύματος, καθ' ότι καταβολίζεται από το μικροφύκος, με αποτέλεσμα τη μη διατήρηση σταθερών τιμών pH στο μέσο της καλλιέργειας. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των Vazhappilly και Chen (1998), τα οποία έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη του *C. conhii* σε ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης ανακινούμενων φιαλών, με τη χρήση γλυκόζης ως καθαρή πηγή άνθρακα, συγκριτικά με το οξικό. Ωστόσο, είναι καλή επιλογή πηγής άνθρακα, αν μπορεί να ρυθμίζεται το pH στο μέσο της καλλιέργειας, όπως μπορεί να συμβεί εύκολα σε βιοαντιδραστήρες. Σε εργαστηριακού τύπου καλλιέργειες με δυνατότητα ρύθμισης του pH, όταν το υπόστρωμα γλυκόζης αντικαταστάθηκε με 50% οξικό, αυξήθηκε η συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας (de Swaaf et al. 2003c).

Ακόμα, οι όξινες συνθήκες δεν δημιούργησαν ουσιαστική καθυστέρηση στην ανάπτυξη της καλλιέργειας, κάτι που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Yue Jiang και Feng Chen (2000), κατά τα οποία παρουσιάστηκε ότι το μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε ένα εύρος τιμών pH (5.5-9), με υψηλότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (0.089 h⁻¹) στο 7.2. Οι φιάλες με το αρχικό pH:5.5 έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη μετά το πέρασμα των 72 ωρών, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 3 13 συγκριτικά με τις φιάλες που ξεκίνησαν σε pH: 6.5. Αυτό συνέβη διότι όπως φαίνεται, η ανάπτυξη του *C.conhii* δημιουργεί αλκαλικές ουσίες που μειώνουν τη συγκέντρωση των κατιόντων υδρογόνου. Συνεπώς, στις 72 ώρες το pH:5.5 είχε φτάσει το 6.9 (βέλτιστο pH όπως αναφέρθηκε) , ενώ το αρχικό pH:6.5 είχε φτάσει το 8.2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3, όπου φαίνεται ξανά πως η παρουσία της ξυλόζης δε λειτουργεί

παρεμποδιστικά και δεν επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό με τον οποίο καταναλώνεται η γλυκόζη. Επιπρόσθετα, η κατανάλωση που λαμβάνει χώρα, υποδηλώνει την δυνατότητα του μικροφύκους να καταβολίζει την ξυλόζη, όπως είχε διαπιστωθεί ήδη. Επίσης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη της βιομάζας και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων στα κύτταρα, η οποία φτάνει ως και 35,41% του ξ.β. βιομάζας. Τέλος, τα ποσοστά συσσώρευσης του DHA επίσης παρέμειναν κοντινά για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ξυλόζης και φτάνουν το 34.5% του συνολικού ξ.β. των λιπαρών οξέων.

3.1.5 Καλλιέργεια του *Cryptocodinium conhii* σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας “SE5: Corn Stover” σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών

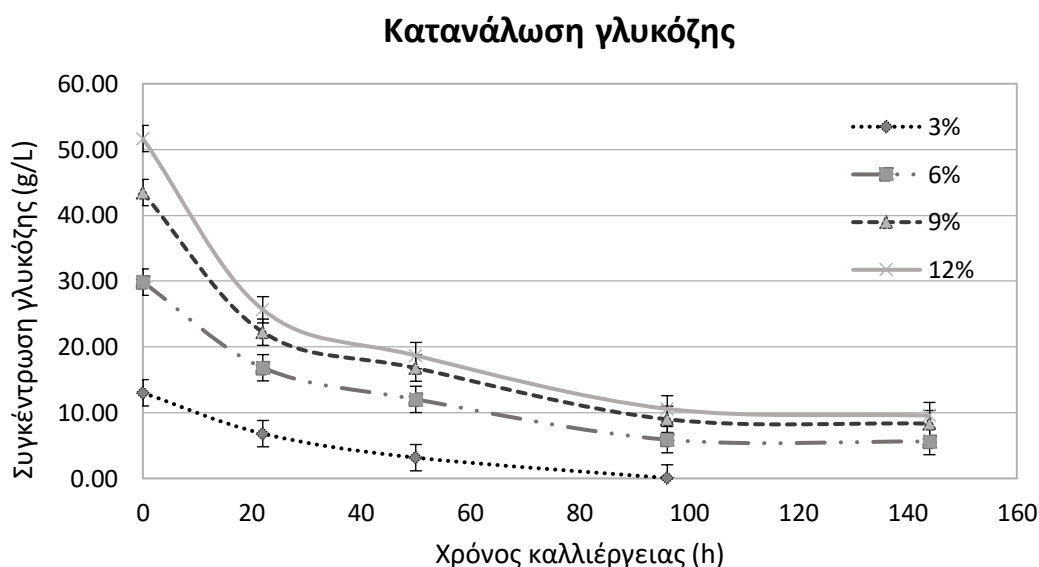
Μελετήθηκε η ικανότητα του μικροφύκους να συσσωρεύει λιπαρά οξέα αξιοποιώντας σάκχαρα προερχόμενα μετά από ενζυμική υδρόλυση της προκατεργασμένης βιομάζας “SE5: Corn Stover”, προϊόν προκατεργασίας με έκρηξη ατμού (νερό με 1% H₂SO₄) και με τελική σύσταση 45% w/w κυτταρίνη και 21% w/w ημικυτταρίνη σε διαφορετικές ποσότητες ξηρής βιομάζας (3,6,9 και 12%)

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα υδρολύσεων της βιομάζας “SE5” σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ξηρής βιομάζας

	Γλυκόζη (g/L)	Γλυκόζη / βιομάζα (mg/g)	Απόδοση Υδρόλυσης (%)
3%	13.02 ± 0.42	216.95	80.36
6%	25.63 ± 0.77	427.22	79.12
9%	35.65 ± 1.23	594.10	73.30
12%	51.67 ± 1.56	861.12	79.74

Πίνακας 3.5 Σχηματισμένα λιπαρά οξέα, μετά την κατανάλωση σακχάρων από την υδρόλυση της βιομάζας “SE5”

	Λιπαρά οξέα (g/L)	Λιπαρά οξέα (% ξ.β. Βιομάζας)	Λιπαρά οξέα/ βιομάζα (mg/g)	Λιπαρά οξέα/ γλυκόζη (mg/g)
3%	2.16	17.40	35.92	3.31
6%	1.68	14.50	28.00	1.31
9%	1.15	17.20	19.24	0.65
12%	1.99	18.30	33.21	0.77



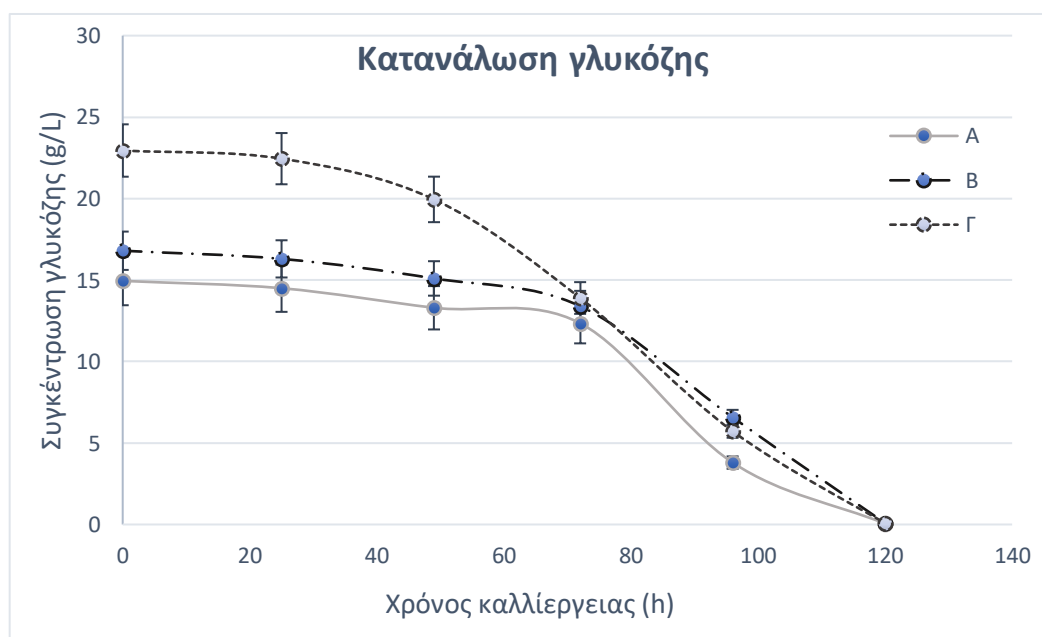
Διάγραμμα 3-15 Κατανάλωση γλυκόζης που προέκυψε από την υδρόλυση της βιομάζας “SE5”

Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης ήταν αρκετά ικανοποιητικά, (υδρόλυση 73-80% της κυτταρίνης), όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.4. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και στο Σχήμα 3 και δείχνουν πως τα κύτταρα του *C. cohnii* μπορούν να χρησιμοποιήσουν επιτυχώς το υδρόλυμα προκατεργασμένης βιομάζας για να συνθέσουν λιπαρά οξέα, ωστόσο με ένα αρκετά χαμηλό ποσοστό λιπαρών οξέων 14.5-18.3 % του ξ.β. του συνολικού ελαίου. Πιθανή αιτία είναι η παρουσία ενώσεων –

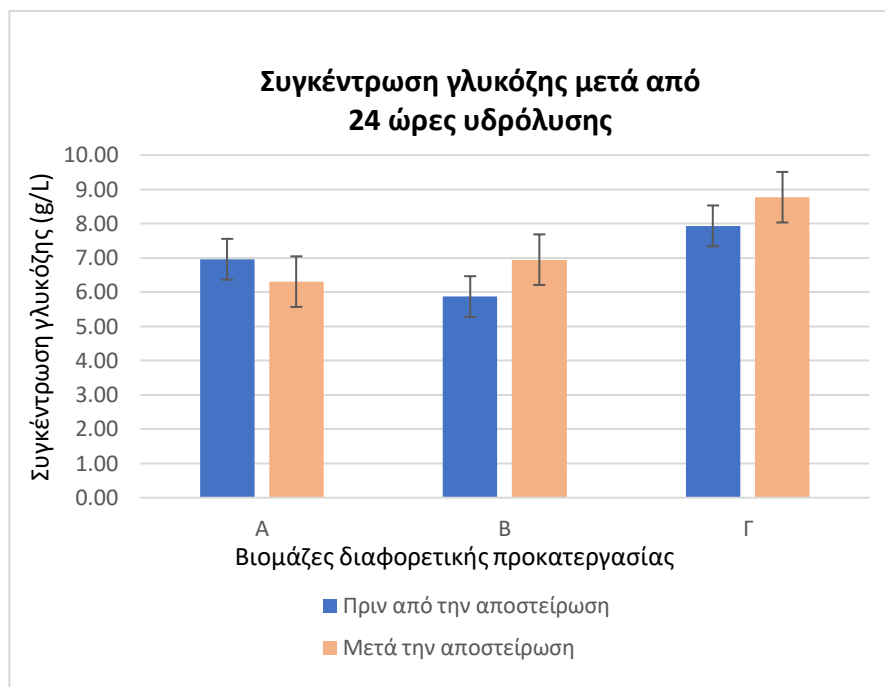
παρεμποδιστών που δημιουργούνται στο υδρόλυμα της βιομάζας μετά την προκατεργασία.

3.1.6 Καλλιέργεια του *Cryptocodinium conhii* σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση διαφορετικών βιομαζών σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών

Ερευνήθηκε η ικανότητα του μικροφύκου να συσσωρεύει λιπαρά οξέα αξιοποιώντας σάκχαρα προερχόμενα μετά από ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων βιομαζών με διαφορετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές στερεές πούλπες. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε ξύλο οξιάς, ενώ πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές προκατεργασίες, (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ)



Διάγραμμα 3-16 Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης



Διάγραμμα 3-17 Συγκέντρωση γλυκόζης μετά από 24 ώρες υδρόλυσης, πριν και μετά από αποστείρωση

Πίνακας 3.6 Συσσώρευση βιομάζας και λιπαρών οξέων παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

	Γλυκόζη (g/L)	Γλυκόζη / Βιομάζα (g/g)	Λιπαρά οξέα (g/L)	Λιπαρά οξέα / Βιομάζα (mg/g)	Λιπαρά οξέα / Γλυκόζη (mg/g)
A	14.95 ± 0.7	0.55	2.19 ± 0.42	81.14	146.53
B	16.8 ± 0.9	0.62	2.17 ± 0.36	80.23	128.94
Γ	22.95 ± 0.7	0.85	1.86 ± 0.27	69.03	81.22

Αρχικά, ερευνήθηκε αν υπάρχει κάποια μεταβολή στη συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την αποστείρωση της 121 °C, 20 λεπτά. Όπως προέκυψε δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση (εντός ορίου σφαλμάτων), πριν και μετά από την αποστείρωση. Αυτό επιτρέπει την αποστείρωση του υδρολύματος πριν την καλλιέργεια χωρίς να επηρεάζει την ποσότητα μονομερών σακχάρων γλυκόζης.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η βιομάζα (Γ) παρήγαγε τα περισσότερα μονομερή σάκχαρα γλυκόζης. Ωστόσο, πιθανότατα λόγω παραγωγής ενώσεων – παρεμποδιστών εντός του υδρολύματος, η λιπογένεση ήταν αρκετά χαμηλή 1.86 (g/L) και 11.60% λιπαρά οξέα (% ξ.β. βιομάζας). Στις άλλες δύο βιομάζες (Α) και (Β), η συσσώρευση λιπαρών ήταν ελαφρώς υψηλότερη συγκριτικά με τη (Γ), αλλά ιδιαίτερα χαμηλή εξίσου.

3.1.7 Συγκεντρώσεις πηγών άνθρακα (γλυκόζη) και αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) ως παράμετροι της καλλιέργειας

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις πηγών άνθρακα (γλυκόζη) και αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) ως παράμετροι που επηρεάζουν την καλλιέργεια και συγκεκριμένα την ανάπτυξη των κυττάρων και τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Παράλληλα, μελετήθηκε η δυνατότητα αύξησης του χρόνου της καλλιέργειας και της συνολικής παραγωγής λιπαρών οξέων με επιπλέον προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου σε ημιτροφοδοτούμενη (fed-batch) καλλιέργεια. Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν επίσης σάκχαρα από υδρόλυμα λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L. Το υδρόλυμα επίσης περιείχε ξυλόζη σε συγκέντρωση ίση με 3.5 g/L. Μετά από 96 ώρες, όπου και παρατηρήθηκε κατανάλωση της γλυκόζης (2-5 g/L σε όλες τις καλλιέργειες), προστέθηκε θρεπτικό που περιείχε επιπλέον πηγής άνθρακα και αζώτου ανά περίπτωση και μελετήθηκε η ανάπτυξη μέχρι τις 280 ώρες της επώασης. Τα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7, δείχνουν πως η καλλιέργεια του μικροφύκου συνεχίστηκε επιτυχώς μετά την προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου, οδηγώντας σε αποδόσεις βιομάζας ως και 20.8 g/L. Η προσθήκη επιπλέον πηγής αζώτου οδήγησε μεν σε αύξηση της βιομάζας, αλλά μείωση στην συσσώρευση λιπαρών οξέων και DHA, το οποίο έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Safdar et al., 2017).

Σε όλες τις περιπτώσεις, το ποσοστό του DHA επί του συνολικού βάρους των λιπαρών ήταν παρόμοιο, φτάνοντας το 40.6% του ξ.β. των λιπαρών οξέων.

Πίνακας 3.7 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πηγής άνθρακα (γλυκόζη) και αζώτου (εκχύλισμα ζύμης). Σε όλα τα πειράματα, ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 280 ώρες, ενώ στις 96 ώρες πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου ανά περίπτωση.

Γλυκόζη (g/L)	YE (g/L)	Προσθήκη πηγής άνθρακα/Αζώτου (96h)	Βιομάζα (g/L)	Λιπαρά οξέα (g/L)	DHA (g/L)	Λιπαρά οξέα (% ξ.β. κυττάρων)	DHA (% του ξ.β. λιπαρών οξέων)
25	2	25 g/L Glc	15.02 ± 1.28	6.15 ± 0.18	2.28 ± 0.15	41.1 ± 2.3	37.08 ± 1.33
25	4	25 g/l Glc	20.78 ± 2.59	5.78 ± 0.39	2.35 ± 0.36	28 ± 1.6	40.39 ± 3.49
25	2	25 g/L Glc/2g/L YE	16.08 ± 1.42	4.81 ± 0.15	2.07 ± 0.01	30.2 ± 3.6	43.19 ± 1.4
50	4	-	17.68 ± 0.97	5.09 ± 0.17	2.06 ± 0.05	28.8 ± 0.6	40.59 ± 2.29
25*	4*	25 g/L BDS*	9.23 ± 0.73	1.13 ± 0.01	0.46 ± 0.01	22.6 ± 0.2	40.31 ± 0.37

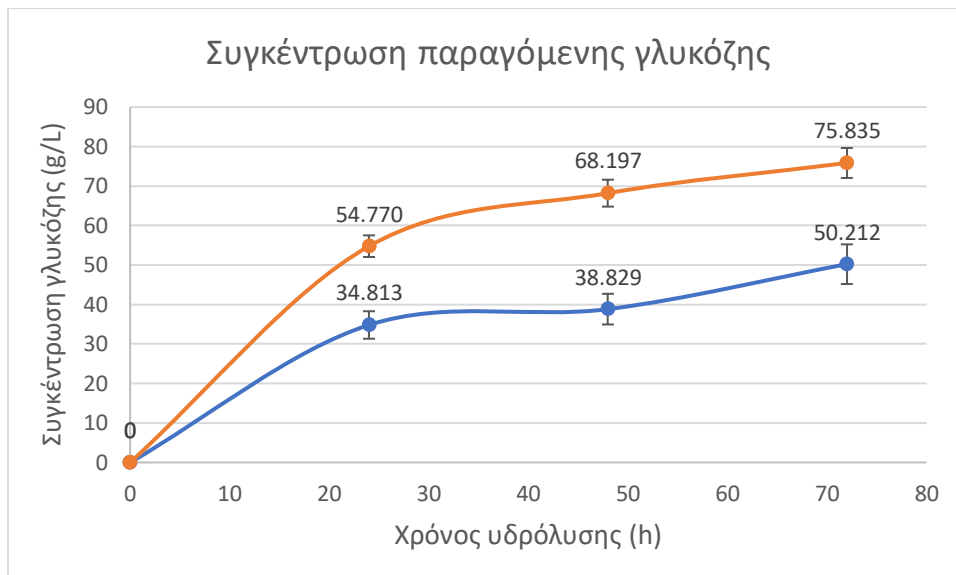
*σάκχαρα από ενζυμική υδρόλυση στερεής πούλπας λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας

3.1.8 Καλλιέργεια του *Cryptocodinium conhii* σε μείγμα σακχάρων προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση δύο διαφορετικών βιομαζών σε ημιτροφοδοτούμενο (fed-batch) σύστημα

Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα του μικροφύκου να συσσωρεύει λιπαρά οξέα αξιοποιώντας σάκχαρα προερχόμενα μετά από ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων βιομαζών με διαφορετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές στερεές πούλπες που προέκυψαν μετά από προκατεργασία με τη βοήθεια. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε ξύλο οξιάς, ενώ πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές προκατεργασίες. Ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση με αποδόσεις 70-85% β/β μετατροπής της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα και, στη συνέχεια, τα σάκχαρα που προέκυψαν αναμείχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L και πηγή αζώτου ίση με 2 g/L, σε pH 6.5, σε καλλιέργειες ημιτροφοδοτούμενης λειτουργίας. Καθώς η κατανάλωση των σακχάρων ήταν πιο αργή σε σχέση με τις καλλιέργειες όπου χρησιμοποιούνταν καθαρά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα, πιθανότατα λόγω παρουσίας

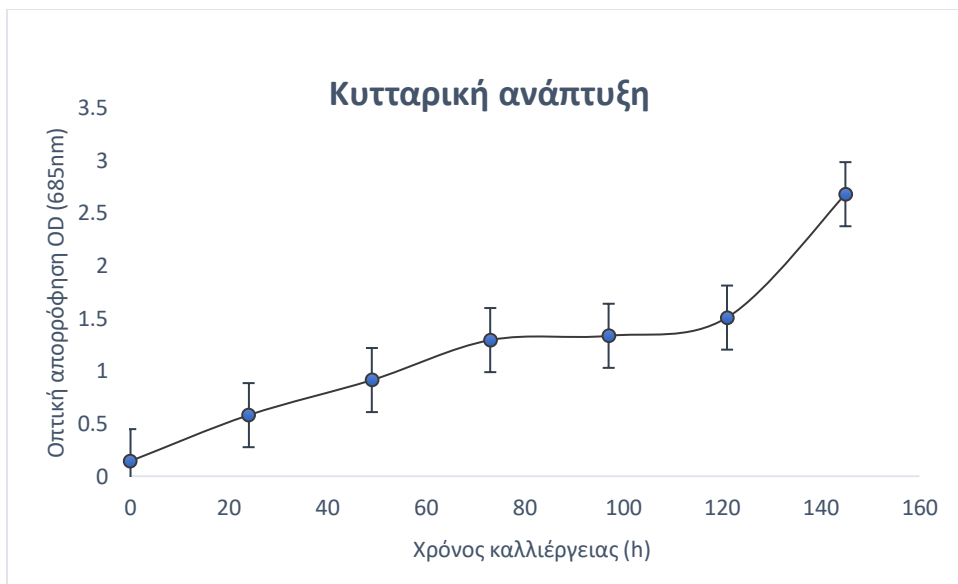
άλλων σακχάρων πέραν της γλυκόζης, η προσθήκη νέου θρεπτικού έγινε στις 98 ώρες. Η καλλιέργεια συνεχίστηκε επιτυχώς μέχρι τις 145 ώρες.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8 δείχνουν πως τα κύτταρα του *C. cohnii* μπορούν να χρησιμοποιήσουν επιτυχώς το υδρόλυμα προκατεργασμένης βιομάζας για να συνθέσουν λιπαρά οξέα, και μάλιστα με ένα υψηλό ποσοστό λιπαρών οξέων που φτάνει τα 42,0% του ξ.β. του συνολικού ελαίου. Η ανάπτυξη των κυττάρων και το συνολικό ποσοστό των λιπαρών είναι αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα σε καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα, όμως τα έλαια που παράγονται στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι καλύτερης ποιότητας λόγω του υψηλού ποσοστού DHA.

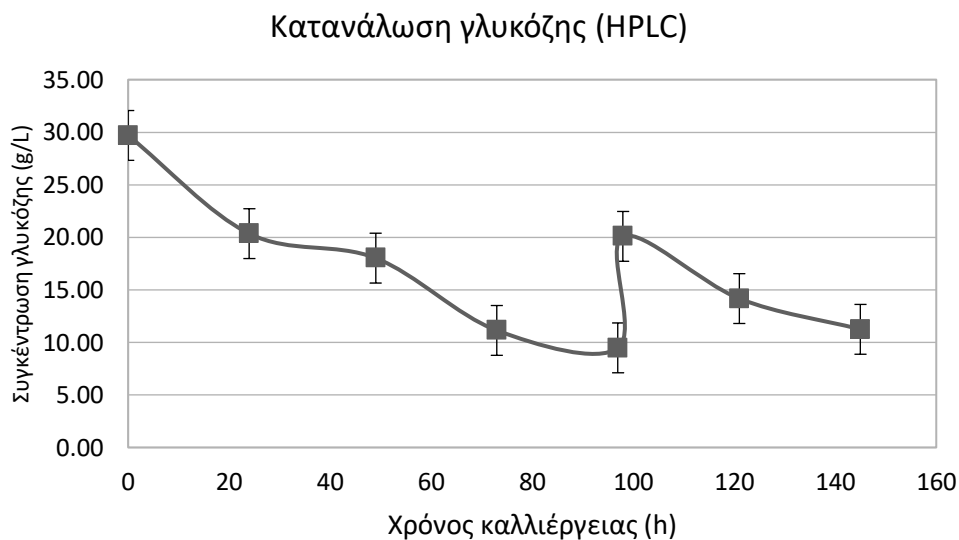


Διάγραμμα 3-18 Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

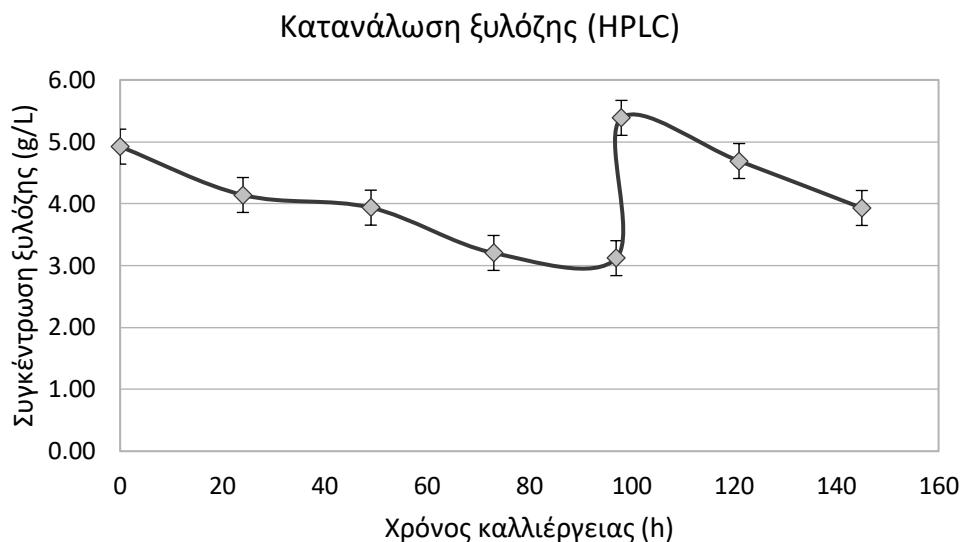
Μείγμα υδρολυμάτων βιομαζών	Συγκέντρωση γλυκόζης	Όγκος	Γλυκόζη
	(g/L)	(mL)	(g)
	62	38.5	2.39



Διάγραμμα 3-19 Κυτταρική ανάπτυξη παρουσία μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης



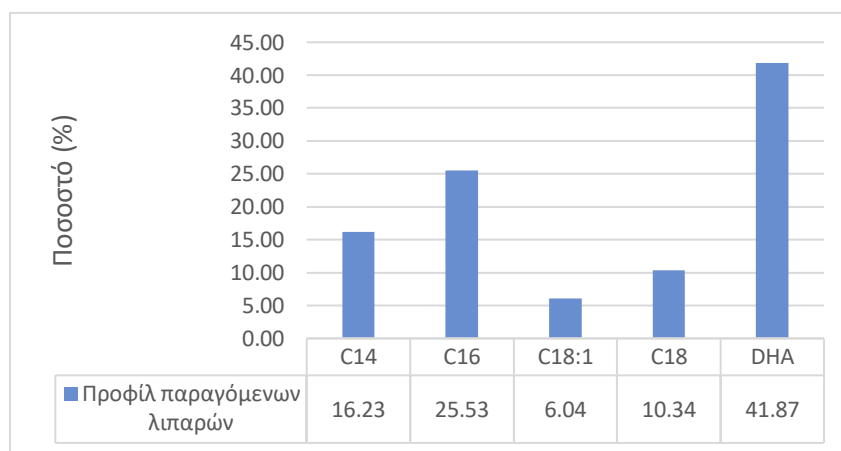
Διάγραμμα 3-20 Κατανάλωση γλυκόζης μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης



Διάγραμμα 3-21 Κατανάλωση ξυλόζης μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

Πίνακας 3.8 Συσσώρευση βιομάζας και λιπαρών οξέων παρουσία μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

Βιομάζα (g/L)	Λιπαρά οξέα (g/L)	Λιπαρά οξέα (% ξ.β. κυττάρων)	DHA (g/L)	DHA (% ξ.β. λιπαρών οξέων)	Παραγωγικότητα DHA (mg/L/h)
9.22 ± 0.7	2.08	22.6 ± 0.2	0.88 ± 0.03	42.0	6.07

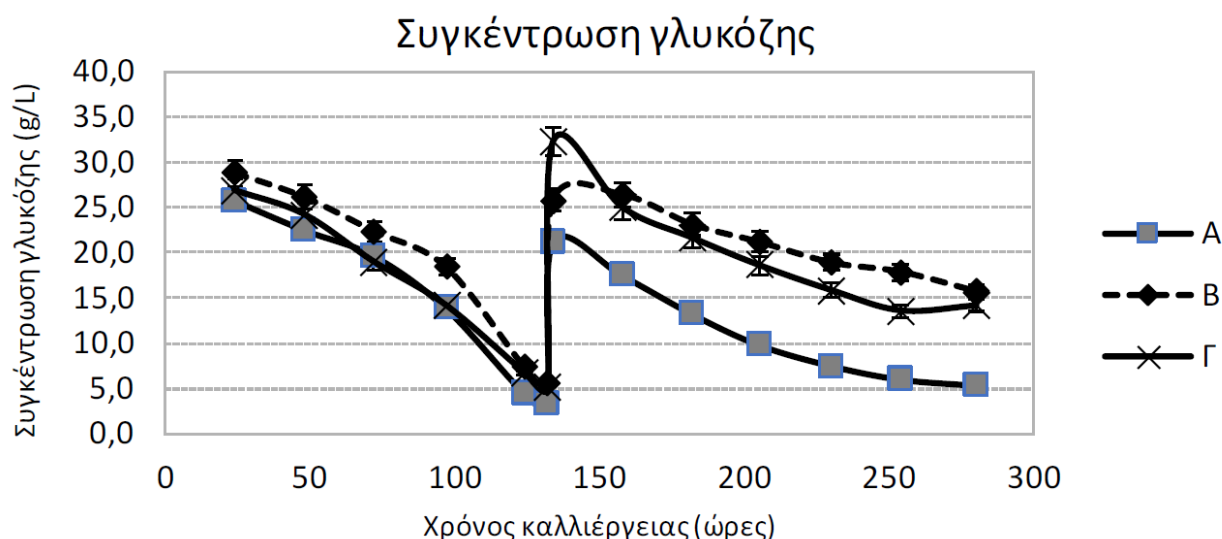


Διάγραμμα 3-22 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών παρουσία μείγματος υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

3.1.9 Καλλιέργεια του *Cryptocodinium conhii* σε σάκχαρα προερχόμενα από την ενζυμική υδρόλυση διαφορετικών βιομαζών σε ετερότροφο σύστημα ανακινούμενων φιαλών

Έπειτα μελετήθηκε η ικανότητα του μικροφύκου να συσσωρεύει λιπαρά οξέα αξιοποιώντας σάκχαρα προερχόμενα μετά από ενζυμική υδρόλυση προκατεργασμένων βιομαζών με διαφορετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές στερεές πούλπες που προέκυψαν μετά από προκατεργασία με τη βοήθεια μιας νέας μεθόδου οργανολυτικής απολιγνίνωσης (organosolv) βιομάζας που στηρίζεται στην ήπια οξειδωση και αποπολυμερισμό της λιγνίνης σε μίγμα νερού – οργανικού διαλύτη (Katsimprouras, 2018). Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε ξύλο οξιάς, ενώ πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές προκατεργασίες: (Α) τετραϋδροφουράνιο/νερό (50/50), 160°C, 16 bar πίεση, 60 λεπτά, (Β) αιθανόλη/νερό (50/50, β/β), 160°C, 16 bar πίεση, 120 λεπτά, (Γ) ακετόνη/νερό (50/50, β/β), 160°C, 8 bar πίεση, 120 λεπτά. Η ανάλυση σύστασης έδειξε πως οι εν λόγω στερεές πούλπες αποτελούνταν σε ποσοστό ξηρού βάρους από: (Α) 68.99% κυτταρίνη, 11.35% λιγνίνη και 15.55% ημικυτταρίνη, (Β) 72.96% κυτταρίνη, 6.44% λιγνίνη και 16.03% ημικυτταρίνη, (Γ) 66.77% κυτταρίνη, 10.45% λιγνίνη και 18.36% ημικυτταρίνη. Ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση με αποδόσεις 70-85% β/β μετατροπής της βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα και, στη συνέχεια, τα σάκχαρα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα, με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L και πηγή αζώτου ίση με 2 g/L, σε pH 6.5, σε καλλιέργειες ημιτροφοδοτούμενης (fed – batch) λειτουργίας. Καθώς η κατανάλωση των σακχάρων ήταν πιο αργή σε σχέση με τις καλλιέργειες όπου χρησιμοποιούνταν καθαρά σάκχαρα ως πηγή άνθρακα, πιθανότατα λόγω παρουσίας άλλων σακχάρων πέραν της γλυκόζης, η προσθήκη νέου θρεπτικού έγινε στις 134 ώρες. Η καλλιέργεια συνεχίστηκε επιτυχώς μέχρι τις 280 ώρες.

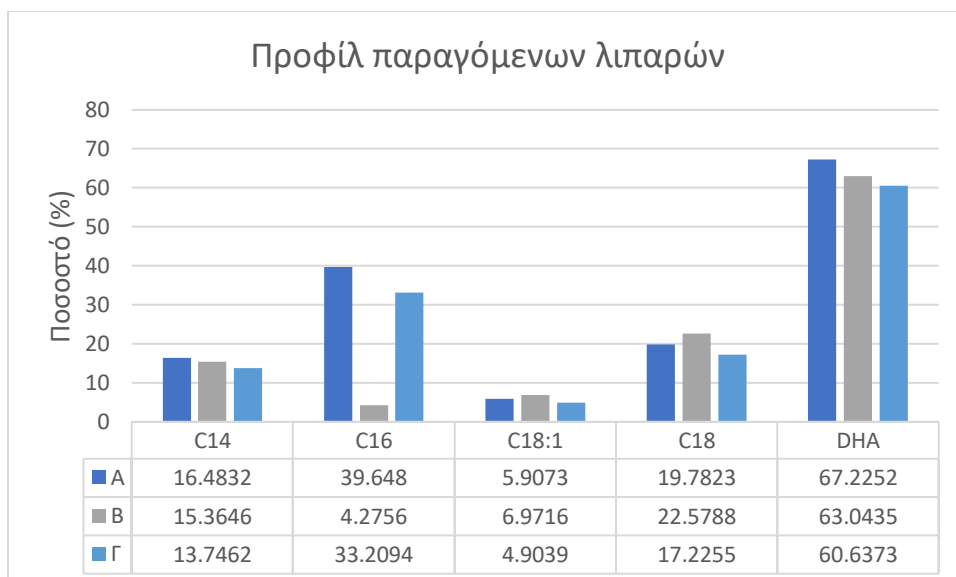
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-23 και στον Πίνακα 3.8 και δείχνουν πως τα κύτταρα του *C. cohnii* μπορούν να χρησιμοποιήσουν επιτυχώς το υδρόλυμα προκατεργασμένης βιομάζας για να συνθέσουν λιπαρά οξέα, και μάλιστα με ένα υψηλό ποσοστό λιπαρών οξέων που φτάνει τα 56.2% του ξ.β. του συνολικού ελαίου. Η τιμή αυτή είναι από τις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Li et al., 2017). Η ανάπτυξη των κυττάρων και το συνολικό ποσοστό των λιπαρών είναι αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα σε καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα, όμως τα έλαια που παράγονται στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι καλύτερης ποιότητας λόγω του υψηλού ποσοστού DHA.



Διάγραμμα 3-23 Κατανάλωση γλυκόζης παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

Πίνακας 3.8 Ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση λιπαρών οξέων παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης. Σε όλα τα πειράματα, ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 280 ώρες, ενώ στις 134 ώρες πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη πηγής άνθρακα (υδρόλυμα από τη βιομάζα).

Δείγμα στερεής πούλπας	Βιομάζα (g/L)	Λιπαρά οξέα (g/L)	Λιπαρά οξέα (% ξ.β. κυττάρων)	DHA (g/L)	DHA (% του ξ.β. λιπαρών οξέων)
A	8.39 ± 0.09	1.05 ± 0.15	17.6 ± 2.1	0.47 ± 0.12	45.1 ± 2.8
B	7.31 ± 0.29	0.65 ± 0.02	17.4 ± 3.2	0.36 ± 0.02	56.17 ± 1.9
Γ	9.03 ± 0.03	1.41 ± 0.08	14.4 ± 0.9	0.66 ± 0.04	46.74 ± 1.5



Διάγραμμα 3-24 Προφίλ παραγόμενων λιπαρών παρουσία υδρολυμάτων που προέρχονται από στερεές πούλπες λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας διαφορετικής σύστασης

Όσον αφορά το προφίλ των βιο-συντιθέμενων λιπαρών οξέων, η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε είναι η μειωμένη παρουσία του παλμιτικού οξέος στην καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε μέσω του υδρολύματος της βιομάζας B. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε ξανά παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ξυλόζης, υποδηλώνοντας πιθανώς την δημιουργία αρκετών πεντοζών κατά την υδρόλυση της συγκεκριμένης βιομάζας, είτε το σχηματισμό άλλων ανασταλτικών ουσιών βιοσύνθεσης παλμιτικού οξέος.

Συγκριτικά με τις τρεις βιομάζες, η Γ είναι εκείνη που ευνοεί την ανάπτυξη βιομάζας, αλλά με χαμηλότερες αποδόσεις λιπαρών οξέων, ενώ η A και η B παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές. Τα εν λόγω αποτελέσματα κρίνονται ιδιαίτερα ελκυστικά για την περαιτέρω μελέτη των υδρολυμάτων λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας ως φθηνή πηγή άνθρακα για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύτταρα του θαλάσσιου δινομαστιγιωτού *C. cohnii* μπορούν να αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει απλά σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) και να συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, όπως το DHA. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε καθυστέρηση της κυτταρικής ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (ειδικότερα, για τιμές μεγαλύτερες από 50 g/L), όπου το βέλτιστο εύρος τιμών να κυμαίνεται μεταξύ 20-35 g/L, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Jiang & Chen, 2000; De Swaaf et al., 1999). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η περίσσεια παρουσία άνθρακα σε συνδυασμό με τον περιορισμό της ποσότητας αζώτου στην καλλιέργεια, αυξάνει την λιπογένεση (Pleissner 2012; Chen & Johns 1991) χωρίς όμως να αλλάζει το προφίλ των παραγόμενων λιπαρών οξέων, και το ποσοστό σχηματισμού DHA έναντι των υπόλοιπων λιπαρών. Ειδικότερα, παρατηρείται μειωμένη συσσώρευση λιπαρών κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, ενώ αυξάνει κατά τη γραμμική ανάπτυξη, λόγω περιορισμού κάποιου θρεπτικού, που επηρεάζει τον μεταβολισμό του μικροφύκου (de Swaaf et al., 2003). Είναι πολύ σημαντικό λοιπόν να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα η συγκέντρωση του άνθρακα, καθ' όλη τη διάρκεια της λιπογένεσης, τόσο για να ξεκινήσει η μεταβολική παραγωγή των λιπιδίων, αλλά και για να μην καταναλωθούν από τον ίδιο τον μικροοργανισμό τα ήδη σχηματισμένα λιπαρά (Wynn et al. 2005; Chen & Johns 1991).

Το φερουλικό οξύ δεν αποτελεί καλή πηγή άνθρακα καθ' ότι η καλλιέργεια αναπτύχθηκε ελάχιστα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο. Αντίθετα, η γουαϊακόλη δεν λειτούργησε παρεμποδιστικά και η καλλιέργεια είχε παρόμοια ανάπτυξη και συσσώρευση λιπαρών, όπως στην περίπτωση της γλυκόζης. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι οι φαινολικές χαρακτηριστικές ομάδες δε λειτουργούν απαραίτητως παρεμποδιστικά για την ανάπτυξη του *C.cohnii*.

Η απόδοση της υδρόλυσης δεν επηρεάζεται από τον όγκο της φιάλης στην οποία πραγματοποιείται, όσο παραμένουν αμετάβλητες οι υπόλοιπες μεταβλητές. Αυτό είναι σημαντικό για την βιομηχανική αξιοποίηση του μικροφύκου, διότι μπορούν να γίνονται εισαγωγικά πειράματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας σε μικρότερη κλίμακα, και αναγωγή των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερη κλίμακα, μειώνοντας το κόστος. Ακόμα, η παρουσία θαλασσινού αλατιού συγκέντρωσης 25 g/L, στο ενζυμικό διάλυμα, δεν προκαλεί αρνητικές ή θετικές επιπτώσεις στην απόδοση της υδρόλυσης.

Η παρουσία της ξυλόζης δεν επηρεάζει το ρυθμό με τον οποίο καταναλώνεται η γλυκόζη, ενώ η κατανάλωση πεντοζών και εξοζών μπορεί να γίνει ταυτόχρονα από το μεταβολισμό του μικροφύκους. Επίσης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη της βιομάζας και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων στα κύτταρα, η οποία φτάνει ως και 46.7% του ξ.β. βιομάζας (**Πίνακας 3.2**). Τα ποσοστά συσσώρευσης του DHA επίσης παραμένουν όμοια για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ξυλόζης και φτάνουν το 34.5% του συνολικού ξ.β. των λιπαρών οξέων. Τέλος, φαίνεται ότι η παρουσία ξυλόζης αναστέλλει το μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης του παλμιτικού οξέος C16:0.

Το οξικό νάτριο δεν αποτελεί καλή επιλογή ρυθμιστικού διαλύματος, καθ' ότι καταβολίζεται από το μικροφύκος, με αποτέλεσμα τη μη διατήρηση σταθερών τιμών pH στο μέσο της καλλιέργειας. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των Vazharrilly και Chen (1998), τα οποία έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη του *C. conhii* σε ετερότροφο σύστημα ανάπτυξης ανακινούμενων φιαλών, με τη χρήση γλυκόζης ως καθαρή πηγή άνθρακα, συγκριτικά με το οξικό. Ωστόσο, είναι καλή επιλογή πηγής άνθρακα, αν μπορεί να ρυθμίζεται το pH στο μέσο της καλλιέργειας (όπως για παράδειγμα με προσθήκη HCL_(aq)), όπως μπορεί να συμβεί εύκολα σε βιοαντιδραστήρες. Σε εργαστηριακού τύπου καλλιέργειες με δυνατότητα ρύθμισης του pH, όταν το υπόστρωμα γλυκόζης αντικαταστάθηκε με 50% οξικό, αυξήθηκε η συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας (de Swaaf et al. 2003c).

Ακόμα, οι όξινες συνθήκες δεν δημιουργήσαν ουσιαστική καθυστέρηση στην ανάπτυξη της καλλιέργειας, κάτι που είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Yue Jiang και Feng Chen (2000), κατά τα οποία παρουσιάστηκε ότι το μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε ένα εύρος τιμών pH (5.5-9), με υψηλότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (0.089 h⁻¹) στο 7.2. Οι φιάλες με το αρχικό pH:5.5 έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη μετά το πέρασμα των 72 ωρών, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 3.13 συγκριτικά με τις φιάλες που ξεκίνησαν σε pH: 6.5. Αυτό συνέβη διότι όπως φαίνεται, η ανάπτυξη του *C.conhii* δημιουργεί αλκαλικές ουσίες που μειώνουν τη συγκέντρωση των κατιόντων υδρογόνου.

Η καλλιέργεια του μικροφύκους σε σύστημα ημιτροφοδοτούμενης λειτουργίας μπορεί να επεκτείνει το χρόνο της καλλιέργειας, με προσθήκη των θρεπτικών που απαιτούνται. Αυτό μπορεί να δώσει τη δυνατότητα στα κύτταρα να συσσωρεύσουν

παραπάνω λιπαρά, αφού πρώτα αναπτυχθούν και εν συνεχεία ξεκινήσουν τη λιπογένεση, περνώντας από την κολυμβητική στη μορφή «κύστης». Η συσσώρευση των λιπαρών αυξάνεται με την περίσσεια παρουσία άνθρακα και με τον περιορισμό του αζώτου, το οποίο όμως είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, ειδικότερα στην αρχική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας. Συνεπώς, το στάδιο μετά το «τάισμα» της καλλιέργειας μπορεί να δημιουργήσει τις βέλτιστες συνθήκες λιπογένεσης, για τον *C. cohnii*, το οποίο διαφέρει από το βέλτιστο αρχικό στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας, όπου απαιτούνται σε περίσσεια τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά. Όπως παρουσιάζονται στον Πίνακας 3.7, δείχνουν πως η καλλιέργεια του μικροφύκου μπορεί να συνεχιστεί επιτυχώς μετά την προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου, οδηγώντας σε αποδόσεις βιομάζας ως και 20.8 g/L. Η προσθήκη επιπλέον πηγής αζώτου οδήγησε μεν σε αύξηση της βιομάζας, αλλά μείωση στην συσσώρευση λιπαρών οξέων και DHA, το οποίο έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Safdar et al., 2017).

Τα κύτταρα του *C. cohnii* μπορούν να χρησιμοποιήσουν επιτυχώς το υδρόλυμα προκατεργασμένης βιομάζας για να συνθέσουν λιπαρά οξέα, και μάλιστα με ένα υψηλό ποσοστό λιπαρών οξέων που φτάνει τα 56.2% του ξ.β. του συνολικού ελαίου (Πίνακας 3.8). Η τιμή αυτή είναι από τις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Li et al., 2017). Η ανάπτυξη των κυττάρων και το συνολικό ποσοστό των λιπαρών είναι αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα σε καλλιέργειες με καθαρά σάκχαρα, όμως τα έλαια που παράγονται στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι καλύτερης ποιότητας λόγω του υψηλού ποσοστού DHA.

Τα εν λόγω αποτελέσματα κρίνονται ιδιαίτερα ελκυστικά για την περαιτέρω μελέτη των υδρολυμάτων λιγοκυτταρινούχου βιομάζας ως φθηνή πηγή άνθρακα για την παραγωγή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων. Τα σάκχαρα από τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φθηνή πηγή άνθρακα για την παραγωγή λιπαρών οξέων μετά από φυσικοχημικές διεργασίες που περιλαμβάνουν προκατεργασία της βιομάζας με τεχνολογία ήπιας οργανολυτικής κλασμάτωσης και εν συνεχεία ενζυμική υδρόλυση της στερεής πούλπας προς την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Με αυτό τον τρόπο, οι υπολειμματικές μορφές βιομάζας, όπως τα αγροτικά παραπροϊόντα μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Μελλοντικοί στόχοι είναι να αποσαφηνιστεί αν η παρουσία ενώσεων που υπάρχουν στη βιομάζα δύνανται να επηρεάζουν παρεμποδιστικά την ανάπτυξη κυττάρων και τη συσσώρευση λιπαρών οξέων. Επίσης, εκτός από το ξύλο οξιάς, στόχος είναι να μελετηθούν και άλλα είδη βιομάζας, όπως υπολείμματα αραβόσιτου, ξύλο πεύκου, κριθάρι, ώστε να βρεθεί εκείνο που μεγιστοποιεί την παραγωγή λιπαρών οξέων αλλά και την καλύτερη ποιότητα ελαίου (με υψηλά ποσοστά DHA).

Επιπρόσθετα, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μία μελέτη για το ρυθμό κατανάλωσης αζώτου από το μικροφύκος, για όλα τα διάρκεια ανάπτυξης και λιπογένεσης των κυττάρων, μέσω αναλύσεων kjeldahl ή άλλων ποσοτικών τεχνικών ανάλυσης αζώτου. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια ο ρυθμός κατανάλωσης αζώτου αλλά και η ποσότητα που υπολείπεται ανά πάσα στιγμή στο θρεπτικό μέσο, για όλα τα στάδια της καλλιέργειας. Συνεπώς, θα μπορέσουν να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις αζώτου που απαιτούνται συνεχώς, για μέγιστη συσσώρευση λιπαρών οξέων ή DHA.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, όσον αφορά: α) τη δυνατότητα του μικροφύκους να αναπτύσσεται παρουσία της υδρολυομένης βιομάζας, β) την μηδαμινή επίδραση που είχε η αλατότητας της καλλιέργειας στην δράση του ενζύμου κυτταρινασών και η αποστείρωση στη συγκέντρωση μονομερών σακχάρων γλυκόζης και γ) η δυνατότητα της καλλιέργειας να αναπτύσσεται σε συνθήκες με $\text{pH} < 5.5$, ανοίγουν τον ορίζοντα για μια νέα μελέτη που αφορά διαδικασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF), έναντι των διαδικασιών διακριτής υδρόλυσης και ζύμωσης (Separated Hydrolysis and Fermentation, SHF), που χρησιμοποιούνται έως σήμερα. Τα δύο πιο σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της διαδικασίας είναι: α) η μείωση του κόστους εξοπλισμού και συντήρησης καθ' ότι μπορεί να εξαλειφθεί ο δεύτερος αντιδραστήρας (σε SHF διαδικασίες απαιτείται ένας αντιδραστήρας για την ανάπτυξη της καλλιέργειας και ένας επιπλέον για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας) από τη διαδικασία παραγωγής PUFAs, και β) η κατανάλωση των παραγόμενων σακχάρων από την υδρόλυση καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό αίροντας την αναστολή της δράσης των ενζύμων - κυτταρινασών, που παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Στόχο αποτελεί επίσης, η μελέτη της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα, ο οποίος θα τροφοδοτείται με σάκχαρα παραγόμενα από την υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας, όπου μπορούν να επιτευχθούν και να διατηρηθούν οι επιθυμητές συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Μέσω της έρευνας μπορεί να παραμετροποιηθεί η διαδικασία, προς μέγιστη απόδοση παραγωγικότητας DHA ή λιπαρών.

Η χρήση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας για την παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ω-3 λιπαρά οξέα, προσφέρει μια οικονομικά ανταγωνιστική και συμφέρουσα εναλλακτική σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες τεχνολογίες και προάγει τη βιωσιμότητα και την αειφόρο ανάπτυξη.

Επιλογικά, λαμβάνοντας υπόψη τα πολλαπλά οφέλη αξιοποίησης της βιομάζας, αλλά και τις ιδιότητες του ελληνικού αγροτικού τομέα, οι καλλιέργειες αυτές αντιπροσωπεύουν μια ελκυστική βιώσιμη λύση, τόσο για την παραγωγή PUFA, όσο και για την αύξηση της ανταγωνιστικότητας του αγροτικού χώρου, την αύξηση του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (ΑΕΠ) σε εθνικό επίπεδο, την ενίσχυση της απασχόλησης και την προστασία του περιβάλλοντος. Η αειφόρος εκμετάλλευση προϊόντων μικρής αξίας, είτε αποβλήτων (όπως είναι τα μη επεξεργασμένα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, που αποτελεί κύριο παραπροϊόν του αγροτικού τομέα), και η μετατροπή τους σε προϊόντα με αξία, αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την ορθή και βιώσιμη τεχνολογική ανάπτυξη. Η ανακύκλωση, οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, η αειφόρος εκμετάλλευση των αποβλήτων και ο σεβασμός στο περιβάλλον αποτελούν βασικούς πυλώνες για την ατέρμονα εξέλιξη, η οποία θα μπορεί να χρησιμοποιεί υλικά και ενέργεια μέσα από μια αστείρευτη πηγή, κλειστού κυκλώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

5.1.1 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Cryptocodium conhii*

Σειρά πειραμάτων	ΠΟΥΛΠΕΣ	AIL removal	ASL removal	Total Lignin removal	Cellulose	Hemicellulose	Galactose	Mannose	Arabinose
3.1.2	A	24.708	-24.536	18.751	110.8729	97.366	0.46	1.54	0.25
	B	50.537	-30.522	40.731	103.0727	81.311	0.34	1.48	0.15
	Γ	51.671	3.18327	45.806	111.1666	85.098	0.28	1.71	0.14
	Δ	46.115	4.96359	41.137	103.8484	82.46	0.36	1.58	0.19
	Ε	60.24	4.25573	53.468	106.6775	70.723	0.23	1.73	0.14
	ΣΤ	39.684	1.30064	35.041	107.7975	81.869	0.34	1.53	0.22
	Z	68.821	35.4272	64.781	101.701	61.763			
3.1.6	A	60.24	4.25573	53.468	106.6775	70.723	0.23	1.73	0.14
	B	39.684	1.30064	35.041	107.7975	81.869	0.34	1.53	0.22
	Γ	85.446	51.2072	81.304	100.2359	35.489	0	1.69	0.08
3.1.8	A	85.446	51.2072	81.304	100.2359	35.489	0	1.69	0.08
	B	97.42	70.6462	94.181	100.8743	33.783	0	1.75	0
3.1.9	A	75.699	35.0466	70.781	102.0223	44.742	0.23	1.53	0.09
	B	88.845	50.8399	84.247	102.5103	43.822	0	1.73	0
	Γ	75.093	43.8265	71.311	105.2566	56.314	0.08	1.87	0.08

Εικόνα 5.1 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Cryptocodium conhii*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Σειρά παραγμάτων	ΠΟΝΤΕΣ	Θερμοκρασία προκυτταρίωσης	Άγριο Πίεση (bar)	Τεχνητή Πίεση (bar)	Ratio	Solvents	Temper ature (°C)	Reaction time (min)	biomass weight (g)	biomass moisture	dry biomass (g)	solvent weight (g)	treated biomass (g)	Pulp moisture	dry pulp (g)	liquid phase (g)	Aqueous phase	acid insoluble lignin %	acid soluble lignin (g/l)	Total lignin	cellulose	hemicellulose	(hemi)cellulose																																																																																																						
																								Α	Β	Γ	Δ	Ε	ΣΤ	Ζ																																																																																															
3.1.2	A	lign_ACO_120918_L	02	16	22	(50/50%) dH2O/ACO	130	240	lignocel	50.64	8	46.59	50.31/250.2	43.1015	6.93	40.1146	372.73	207.44	17.41	3.963	21.373	50.76	22.91	73.67	95.043																																																																																																				
																										B	lign_THF_240818_L	02	16	14	(50/50%) dH2O/THF	130	240	lignocel	50.4	8	46.37	50.48/250.1	38.3709	5.25	36.3564	338.26	193.26	12.56	4.561	17.1211	51.82	21.01	72.83	89.9511																																																																											
																																																			C	lign_ACO_190618_L-a	02	16	26.1	(50/50%) dH2O/ACO	150	60	lignocel	50.31	8	46.29	50.29/250.2	37.8964	6.95	35.2626	356.88	-	12.63	3.482	16.112	57.52	22.63	80.15	96.262																																																		
																																																																												D	lign_EOH_250618_L	02	16	25.5	(50/50%) dH2O/EOH	150	60	lignocel	50.19	8	46.17	50.26/250.5	39.7024	7.3	36.8041	396.3	106.94	13.46	3.267	16.727	51.36	20.96	72.32	89.047																									
																																																																																																					E	lign_THF_250618_L	02	16	14	(50/50%) dH2O/THF	150	60	lignocel	50.1	8	46.09	50.27/250.0	34.4912	6.96	32.0906	333.86	196.83	11.37	3.768	15.138	60.4	20.58	80.98	96.118
G	lign_ACO_030418_L	02	16	29.1	(10/90%) dH2O/ACO	175	120	lignocel	50.5	8	46.46	0.28/450.2	32.4589	6.86	30.2322	350.33	45.4	9.54	2.719	12.259	61.61	19.23	80.84	93.099																																																																																																					
																									H	lign_THF_250618_L	02	16	14	(50/50%) dH2O/THF	150	60	lignocel	50.1	8	46.09	50.27/250.0	34.4912	6.96	32.0906	333.86	196.83	11.37	3.768	15.138	60.4	20.58	80.98	96.118																																																																												
																																																		I	lign_ACO_NiMo_190718	02	16	25.9	(50/50%) dH2O/ACO	150	60	lignocel	50.89	8	46.82	0.67 & 2.50	42.4354	7.54	36.7000	374.2	191.1	15.32	3.45	18.77	54.21	21.16	75.37	94.14																																																			
																																																																											J	lign_THF_120718_L	02	16	14.1	(50/50%) dH2O/THF	150	120	lignocel	50.27	8	46.25	50.90/250.1	26.4462	5.46	25.0022	354.01	206.1	5.36	2.473	7.833	73.09	13.3	86.39	94.223																										
																																																																																																				K	lign_ACO_091018_L	02	16	22.9	(50/50%) dH2O/EOH	175	60	lignocel	50.62	8	46.57	50.12/250.5	24.2948	6.22	22.7837	413.81	144.15	1.05	1.644	2.694	81.28	13.99	95.27	97.964	
																																																																																																																													L
M	lign_EOH_210818_L	02	16	20.8	(50/50%) dH2O/EOH	160	120	lignocel	50.6	8	46.55	50.24/250.3	27.0861	4.81	25.7833	390.11	147.19	4.01	2.432	6.442	72.96	16.03	88.99	95.432																																																																																																					
																									N	lign_ACO_230818_L	02	8	15.1	(50/50%) dH2O/ACO	160	120	lignocel	50.8	8	46.74	50.23/250.8	30.5487	4.93	29.0426	355.02	202.24	7.98	2.477	10.4568	66.77	18.36	85.13	95.5868																																																																												
																																																		O	lign_THF_180718_L	02	16	15.6	(50/50%) dH2O/THF	160	60	lignocel	50.11	8	46.10	50.21/250.1	29.3228	8.35	26.8743	340.9	200.68	8.3	3.053	11.353	68.99	15.55	84.54	95.893																																																			
																																																																											P	lign_ACO_210818_L	02	16	20.8	(50/50%) dH2O/EOH	160	120	lignocel	50.6	8	46.55	50.24/250.3	27.0861	4.81	25.7833	390.11	147.19	4.01	2.432	6.442	72.96	16.03	88.99	95.432																										
																																																																																																				Q	lign_ACO_230818_L	02	8	15.1	(50/50%) dH2O/ACO	160	120	lignocel	50.8	8	46.74	50.23/250.8	30.5487	4.93	29.0426	355.02	202.24	7.98	2.477	10.4568	66.77	18.36	85.13	95.5868	

Εικόνα 5.2 Δεδομένα λιγνοκυτταρινούχων βιομαζών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μικροφύκου *Cryptocodium conhii*

5.1.2 Δεδομένα ενζύμου κυτταρινασών, που χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο της υδρόλυσης

Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials

Storage in application

The recommended storage conditions are 0–25 °C (32–77 °F) in sealed packaging, well-protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. However, enzymes gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions such as higher temperature may lead to a higher dosage requirement.

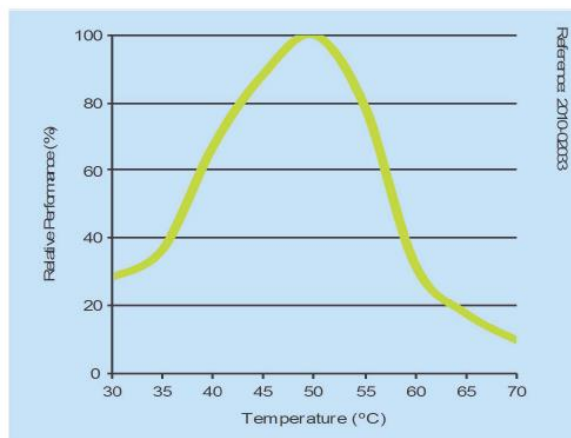


Figure 1: Temperature curve

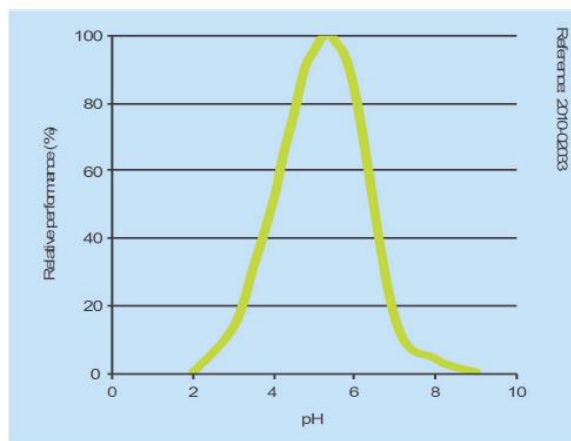
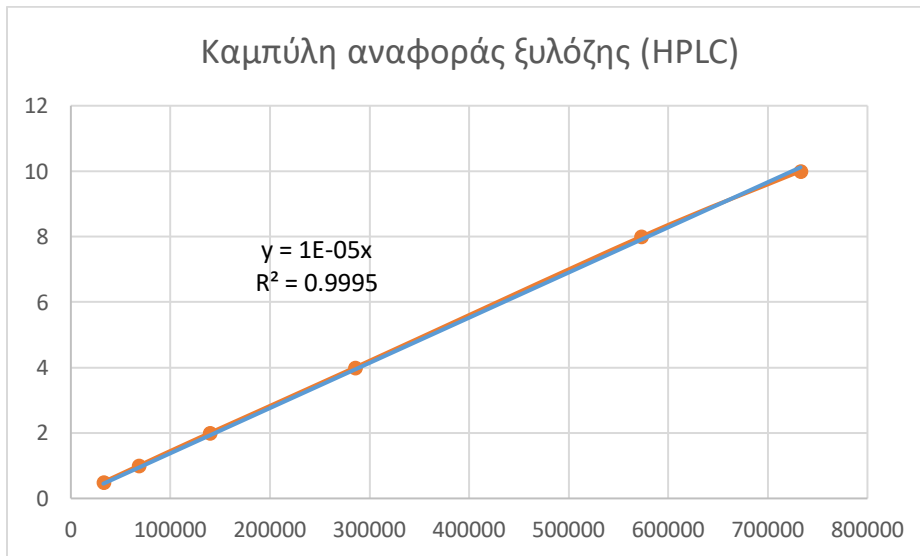
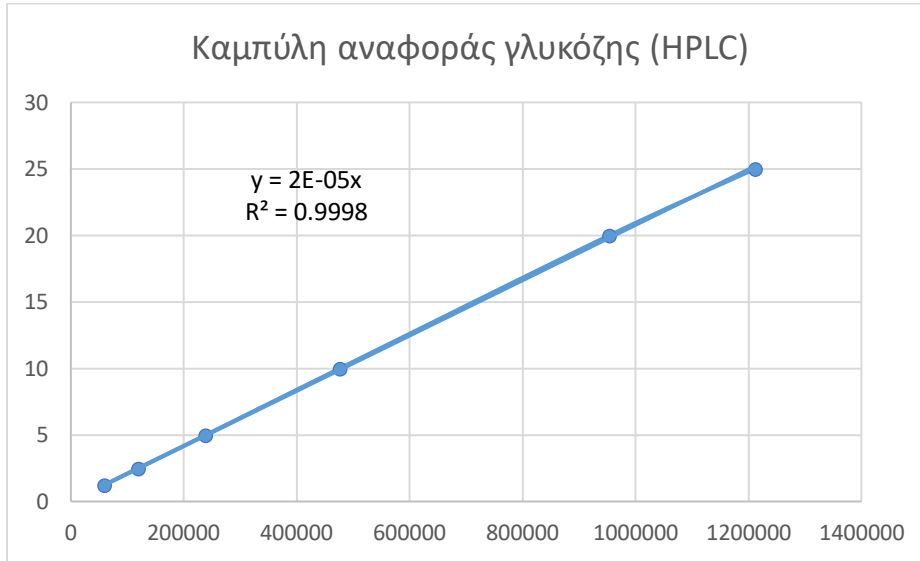
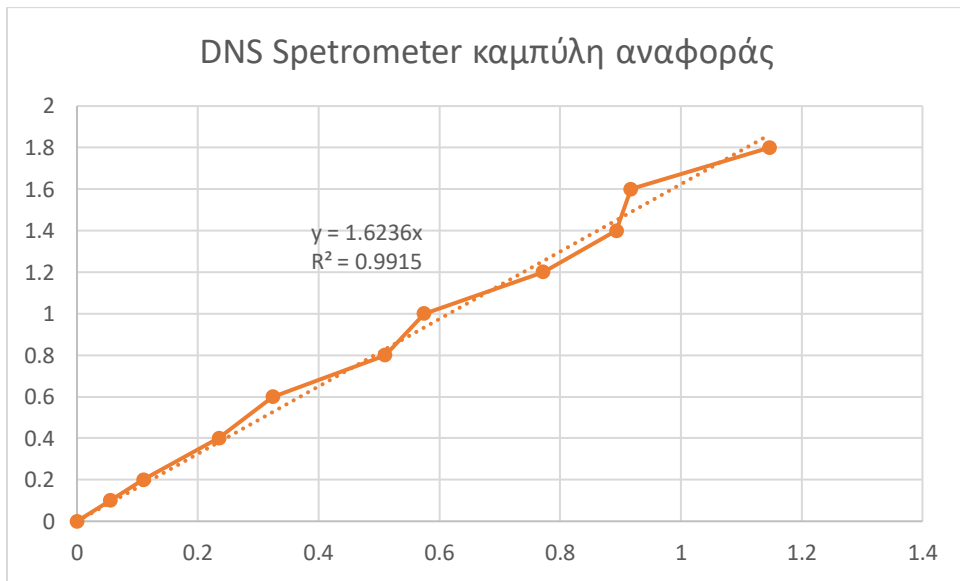
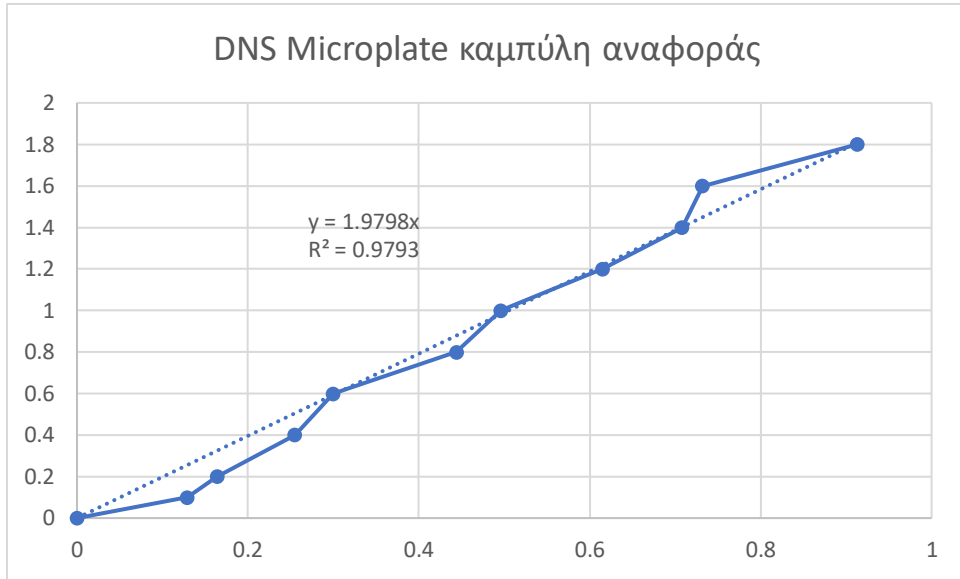


Figure 2: pH curve

Εικόνα 5.3

5.1.3 Καμπύλες αναφοράς





5.1.4 Στοιχεία για τον μικροοργανισμό *Cryptocodinium cohnii* (ATCC® 30722™)



Product Sheet

Cryptocodinium cohnii (ATCC® 30772™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -70°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Protocols Section

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Cryptocodinium cohnii* (ATCC® 30772™)

Description

Strain Designation: PGM-1
Deposited Name: *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornicky
Depositor: CA Beam, M Himes
Isolation: *Macrocystis* sp., Pacific Grove, CA, 1977

Propagation

Growth Conditions
Temperature: 20°C to 25°C
Culture System: Axenic

Medium
ATCC® Medium 460: A2E6 medium

Protocols

Storage and Culture Initiation

Frozen ampules packed in dry ice should either be thawed immediately or stored in liquid nitrogen. If liquid nitrogen storage facilities are not available, frozen ampules may be stored at or below -70°C for approximately one week. **Do not under any circumstance store frozen ampules at refrigerator freezer temperatures (generally -20°C).** Storage of frozen material at this temperature will result in the death of the culture.

1. To thaw a frozen ampule, place it in a 35°C water bath, until thawed (2-3 min). Immerse the ampule just sufficient to cover the frozen material. Do not agitate the ampule.
2. Immediately after thawing, aseptically transfer the entire contents to a screw-capped borosilicate test tube containing 5 mL of ATCC Medium 460. Do not distribute the thawed material to a larger volume of medium. It is essential to first establish the culture in a small volume. Incubate the tube at 20°C to 25°C with the cap loosened one half turn. Subculture every 10-14d.

Cryopreservation

1. Harvest cells from cultures which are at or near peak density. Aseptically transfer cells to 15 mL plastic centrifuge tubes and centrifuge at ~150 x g for 5 min.
2. Adjust the concentration of cells to 2 x 10⁶/mL with fresh medium, then dilute to half this concentration by adding an equal amount of a 15% (v/v) sterile glycerol solution in fresh medium.
3. Dispense in 0.5 mL aliquots into 1.0 - 2.0 mL sterile plastic screw-capped cryovials (special plastic vials for cryopreservation). The time from mixing of the cell suspension and the glycerol solution, before the cooling cycle begins, should be no greater than 15 min.
4. Place vials in a controlled rate freezing unit. From room temperature cool at -1°C/min to -40°C. If freezing unit can compensate for the heat of fusion, maintain rate at -1 C/min through heat of fusion. At -40°C plunge ampules into liquid nitrogen. Alternatively, place the vials in a Nalgene 1°C freezing apparatus. Place the apparatus at -80°C for 1.5 to 2 hours and then plunge ampules into liquid nitrogen. (The cooling rate in this apparatus is approximately -1°C/min.)
5. The frozen preparations should be stored in either the vapor or liquid phase of a nitrogen refrigerator. Frozen preparations stored below -130°C are stable indefinitely. Those stored at temperatures above -130°C are progressively less stable as the storage temperature is elevated. Vials can be stored between -80 and -70°C for no longer than one week.
6. To establish a culture from the frozen state place an ampule in a water bath set at 35°C. Immerse the vial to a level just above the surface of the frozen material. Do not agitate the vial.
7. Immediately after thawing, do not leave in the water bath, aseptically remove the contents of the ampule and transfer to a fresh tube containing 5 mL of ATCC Medium 460. Incubate the tube vertically at 20-25°C with the cap loosened one half turn. Subculture every 10-14d.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

5.1.5 Στοιχεία για τον θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *Cryptocodinium conhi* ATCC® Medium 460: A2E6 medium

ATCC® Medium 460: A2E6 medium

Storage & Culture Initiation

Frozen ampules packed in dry ice should either be thawed immediately or stored in liquid nitrogen. If liquid nitrogen storage facilities are not available, frozen ampules may be stored at or below -70°C for approximately one week. Do not under any circumstance store frozen ampules at refrigerator freezer temperatures (generally -20°C). Storage of frozen material at this temperature will result in the death of the culture. To thaw a frozen ampule, place it in a 35°C water bath, until thawed (2-3 min). Immerse the ampule just sufficient to cover the frozen material. Do not agitate the ampule. Immediately after thawing, aseptically transfer the entire contents to a screw capped borosilicate test tube containing 5 mL of ATCC Medium 460. Do not distribute the thawed material to a larger volume of medium. It is essential to first establish the culture in a small volume. Incubate the tube at 20°C to 25°C with the cap loosened one half turn. Subculture every 10-14d.

Culture Maintenance

1. Inoculate a tube of fresh medium with 0.1 mL from a growing culture at or near peak density.

2. Incubate the tube at 20°C to 25°C with the cap loosened one half turn. Subculture every 10-14d. 1. Harvest cells from cultures which are at or near peak density. Aseptically transfer cells to 15 mL plastic centrifuge tubes & centrifuge at ~150 x g for 5 min. 2. Adjust the concentration of cells to 2×10^6 /mL with fresh medium, then dilute to half this concentration by adding an equal amount of a 15% (v/v) sterile glycerol solution in fresh medium.

3. Dispense in 0.5 mL aliquots into 1.0 – 2.0 mL sterile plastic screw-capped cryules (special plastic vials for cryopreservation). The time from mixing of the cell

suspension & the glycerol solution, before the cooling cycle begins, should be no greater than 15 min.

4. Place vials in a controlled rate freezing unit. From room temperature cool at $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -40°C . If freezing unit can compensate for the heat of fusion, maintain rate at $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ through heat of fusion. At -40°C plunge ampules into liquid nitrogen. Alternatively, place the vials in a Nalgene 1°C freezing apparatus. Place the apparatus at -80°C for 1.5 to 2 hours & then plunge ampules into liquid nitrogen. (The cooling rate in this apparatus is approximately $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.)

5. The frozen preparations should be stored in either the vapor or liquid phase of a nitrogen refrigerator. Frozen preparations stored below -130°C are stable indefinitely. Those stored at temperatures above -130°C are progressively less stable as the storage temperature is elevated. Vials can be stored between -80 & -70°C for no longer than one week.

6. To establish a culture from the frozen state place an ampule in a water bath set at 35°C . Immerse the vial to a level just above the surface of the frozen material. Do not agitate the vial.

7. Immediately after thawing, do not leave in the water bath, aseptically remove the contents of the ampule & transfer to a fresh tube containing 5 mL of ATCC Medium 460. Incubate the tube vertically at $20/25^{\circ}\text{C}$ with the cap loosened one half turn. Subculture every 10-14d.

ATCC Medium: 460 A2E6 Medium

Base Medium

NaCl.....	23.48 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O.....	10.63 g
Na ₂ SO ₄	3.92 g
CaCl ₂ (anhydrous).....	1.11 g
KCl.....	0.66 g
NaHCO ₃	0.19 g
KBr.....	0.1 g
H ₃ BO ₃	0.03 g
SrCl ₂ x 6H ₂ O.....	0.04 g
Metal Mixture (see below).....	3.0 ml
FeCl ₃ x 6H ₂ O.....	0.01 g
Na ₂ Glycerophosphate.....	0.15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 g
Tris Buffer.....	3.0 g
Vitamin Solution (see below).....	1.0 ml
K ₂ HPO ₄	0.01 g
Glucose.....	3.0 g
Glutamic Acid.....	1.5 g
DI Water.....	1000 ml

Adjust pH to 6.4-6.6. Dispense into appropriate vessel and autoclave at 121°C.

*Dispense 5ml for 16 x 125 mm test tube.

Metal Mixture

Na ₂ EDTA.....	1.0 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O.....	0.05 g
H ₃ BO ₃	1.0 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O.....	0.15 g
ZnCl ₂	0.01g
CoCl ₂ x 6H ₂ O.....	0.005 g
DI Water.....	100 ml

Vitamin Solution

Biotin.....	0.003 g
Thiamine.....	1.0 g
DI Water.....	1000 ml

5.1.6 Συμμετοχές σε συνέδρια/ δημοσιεύσεις

Μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας δημοσιεύθηκε και παρουσιάστηκε στα:

- **12ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής,**
Αθήνα, Μάϊος 2019
(https://12pesxm.chemeng.ntua.gr/view_author/684)
- **7ο Διεθνές Συνέδριο για την Αειφόρο Διαχείριση Αποβλήτων,**
Ηράκλειο, Ιούνιος 2019
(<http://greenagenda.gr/wp-content/uploads/2019/06/HERAKLION-2019-agenda.pdf>) *Bioprocesses, Biorefineries in waste management II, SESSION XIX*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΠΗΓΕΣ & ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra, T. Lopes da Silva, *Crypthecodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review, *J. Appl. Phycol.* 21 (2008) 199-214.

A. Shrotri Hirokazu Kobayashi Atsushi Fukuoka Chapter Two - Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals
<https://doi.org/10.1016/bs.acat.2017.09.002>

Ackman RG, Jangaard PM, Hoyle RJ, Brockerhoff H (1964) Origin of marine fatty acids. Analysis of the fatty acids produced by the diatom *Skeletonema costatum*. *J Fish Res Bd Canada* 21:747-756

Anamnart S, Tomita T, Fukui F, Fujimori K, Harashima S, Yamada Y, Oshima Y (1997) The POLE1 gene of *Pichia angusta* encodes a $\Delta 9$ -fatty acid desaturase and complements the ole1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 184:299-306

Apt, K.E. and Behrens, P.W. (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol*, 35:215{226.

Atalah, E. Hern_andez-Cruz, C.M., Izquierdo, M.S., Rosenlund, G., Caballero, M.J., Valencia, A. and Robaina, L., 2015 (In press) Two microalgae *Crypthecodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270(1{4):178{185.

Barclay, W.R., Bailey, R.B., DiMasi, D., Hansen, J.M., Mirrasoul, P.J., Ruecker, C.M., Veeder III, G.T. and Kaneko, T. (2003) Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. United States Patent: 09,771,352,

Barclay, W.R., Meager, K.M. and Abril, J.R. (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycol*, 6:123{129.

Barclay, W.R., Terry, K.L., Nagle, N.J., Weissman, J.C. and Goebel, R.P.(1987) Potential of new strains of marine and inland saline-adapted microalgae for aquaculture. *J World Aquacult Soc*, 18:218{228.

Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Cobcroft, J.M., Nichols, P.D., Brown, M.R. and Carson, J. (2006) Combined effects of feeding enriched rotifers and antibiotic addition on performance of striped trumpeter (*Latris lin-eata*) larvae. *Aquaculture*, 251(1{2):456{471.

Beach DH, Holz GG (1973) Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. *Acta* 316:56

- Beam CA, Himes M (1974) Evidence for sexual fusion and recombination in the dinoflagellate *Cryptothecodinium (Gyrodinium) cohnii*. *Nature* 250:435-436
- Beguín, P.; Aubert, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 13, 25–58.].
- Bell, J.G., Torstensen, B. and Sargent, J.R. (2005) Replacement of marine fish oils with vegetable oils in feeds for farmed salmon. *Lipid Tech*, 17:7{11.
- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C. and Sargent, J.R. (1995) Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 30(5):443{449.
- Beney, L. and Gervais, P. (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of organisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotech*, 57:34{42.
- Benitez-Santana, T., Masuda, R., Juarez-Carrillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernandez-Cruz, C.M. and Izquierdo, M.S. (2006) Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 34(1):100{117.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M. and Fernandez-Palacios, H. (1999) Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 127(1{4):265{276.
- Bhaud Y, Salmon JM, Soyer-Gobillard MO (1991) The complex cell cycle of the dinoflagellate protist *Cryptothecodinium cohnii* as studied in vivo and by cytofluorimetry. *J Cell Science* 100:675-682
- Bistrain, B.R. (2003) Clinical aspects of essential fatty acid metabolism: Jonathan Rhoads lecture. *J Parent Ent Nutr*, 27(3):168{175.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C.L., Harmon, P. and Gunmoye, K. (2003) Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*, 225(1{4):451{461.
- Bloch K (1969) Enzymatic synthesis of monounsaturated fatty acids. *Acc Chem Res* 2: 193-202 Bloomfield DK, Bloch K (1960) Formation of 9-unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 235:337-345
- Borowitzka MA (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7:3-15

Borowitzka, M.A. (1997) Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J Appl Phycol*, 9(5):393{401.

Brenna, J.T. (2002) Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chainn-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr*, 5(2):127{132.

Brenner, R.R. (2003) Hormonal modulation of Δ 6 and Δ 5-desaturases: case of diabetes. *Prostag Leukotr Ess*, 68(2):151{162.

British Nutrition Foundation (1992) In: Unsaturated fatty acids, nutritional and physiological significance. The report of the British Nutrition Foundation's task force, Chapman and Hall, London, pp 152

Broadhurst, C.L. and Wang, Y. (2002) Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochem Phys B*, 131(4):653{673.

Brown, M.F. (1994) Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chem Phys Lipids*, 73(1{2):159{180.

Brugere, C. and Ridler, N. (2004) Global aquaculture outlook in the next decades: an analysis of national aquaculture production forecasts 2030. *Fisheries Circular 1001*, FAO, Rome.

Burdge, G.C. and Wootton, S.A. (2002) Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Brit J Nutr*, 88(4):411{420.

Burgess, J.R., Stevens, L., Zhang, W. and Peck, L. (2000) Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr*, 71(1):327{330.

Buzzi, M., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. (1997) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp Biochem Phys B*, 116(2):263{267

C.V. Nicholson DECEMBER 21, 2010 NEW YORK TIMES "DSM to Buy Martek Biosciences for \$1.1 Billion" (<https://dealbook.nytimes.com/2010/12/21/dsm-to-buy-martek-biosciences-for-1-1-billion/>).

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. and Takeuchi, T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227(1{4):254{258.

Calder, P.C. (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *P NutrSoc*, 61(3):345{358.

Calder, P.C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F.A. and Miles, E.A. (2002) Fatty acids and lymphocyte functions. *Brit J Nutr*, 87(1):31{48.

Carlson SE (1996) Arachidonic acid status of human infants: Influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids. *J Nutr* 126:S1092-S1098

Carter, C.G., Bransden, M.P., Lewis, E.T. and Nichols, P.D. (2003) Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Marine Biotechnology*, 5:480{492.

Castro LFC, Tocher DR, Monroig O. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Prog Lipid Res.* 2016; *Prog Lipid Res.* 2016 Apr; 62:25-40. doi: 10.1016/j.plipres.2016.01.001.

Cavalier-Smith, T., Allsopp, M.T.E.P. and Chao, E.E. (1994) Thraustochytrids are chromists, not fungi: 18S rRNA signatures of heterokonta. *Philos T Royal Soc B*, 348(1318):387{397.

Chalima A, A. Hatzidaki, A. Karnaouri, E. Topakas E. *Applied Energy* 214 (2019) 130-138.

Chen F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *TIBTECH*14:421-426

Chen F, Johns MR (1991) Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phycol* 3:203–209
doi:10.1007/BF00003578

Chen, C. and Bazan, N.G. (2005) Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prost Oth Lipid M*, 77:65{76.

Choi JY, Stuke J, Hwang SY, Martin CE (1996) Regulatory elements that control transcription, activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* 271:3581-3589

Cole, G.M., Lim, G.P., Yang, F., Teter, B., Begum, A., Ma, Q., Harris-White, M.E. and Frautschy, S.A. (2005) Prevention of Alzheimer's disease: -3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiology Aging*, 26(1):133{136.

Colwell RR (1997) Microbial diversity and biotechnology. In: Reaka-Kudla ME, Wilson E (eds) *Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources*. Joseph Henry Press, Washington, DC, pp 279-287

Connor, W.E. (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*, 71(1):171{175.

Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A. and Harel, M. (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail ounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*,210(1):285{304.

Crawford, M.A., Bloom, M., Broadhurst, C.L., Schmidt, W.F., Cunnane, S.C., Galli, C., Gehbremeskel, K., Linseisen, F., Lloyd-Smith, J. and Parkington, J. (1999) Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids*, 34:39{47.

Cunnane, S.C. (2000) The conditional nature of the dietary need for polyunsaturates: a proposal to reclassify essential fatty acids as conditionally indispensable or conditionally-dispensable fatty acids. *Brit J Nutr*,84(6):803{812.

Cutts, C.J., Sawanboonchun, J., Mazorra de Quero, C. and Bell, J.G. (2006) Diet-induced differences in the essential fatty acid (EFA) compositions of larval Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with reference to possible effects of dietary EFAs on larval performance. *ICES J Mar Sci*, 63(2):302{310.

D. Pleissner, N.T. Eriksen, Effects of phosphorous, nitrogen, & carbon limitation on biomass composition in batch & continuous flow cultures of the heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 2005–2016

de Swaaf, M.E., Pronk, J.T. and Sijtsma, L. (2003) Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(1):40{43.

Demain AL, Newcomb M, Wu JHD (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol *Microbiology and Molecular Biology* 69: 124-154.

Duff SJB, Murray WD (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology* 55: 1-33.

Emken, E.A., Adolf, R.O. and Gulley, R.M. (1994) Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labelled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta*, 1213(3):277{288.

Eneko Ganuza T. (2008) Heterotrophic cultivation of microalgae as a source of docosahexaenoic acid for culture, (IUSA)

Evjemo, J.O., Danielsen, T.L. and Olsen, Y. (2001) Losses of lipid, protein and n-3 fatty acids in enriched *Artemia franciscana* starved at different temperatures. *Aquaculture*, 193(1{2}):65{80.

FAO (2004) Collation, analysis and dissemination of global and regional fishery statistics. Fi programme websites http://www.fao.org/_gis/ [Accessed Dec 15 2006]., Fishery Information, Data and Statistics Unit (FAO-FIDI), Rome, pp. 144.

FAO/WHO (1994) Fats and oils in human nutrition. Joint expert consultation. Food and Nutrition, 57, (FAO/WHO) World Health Organisation, Rome, pp 120.

FAO/WHO Expert committee (1994) Food and nutrition paper no 57. FAO, Rome
Gerbling H, Axiotis S, Douce R (1994) A new acyl-CoA synthetase, located in higher plant cytosol. *J Plant Physiol* 143:561-564

Faulk, C.K. and Holt, G.J. (2005) Advances in rearing coho salmon *Oncorhynchus kisutch* larvae in recirculating aquaculture systems: live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture*, 249(1{4}):231{243.

Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J. and Hippen, A.R. (1999) Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations

Ganga, R., Bell, J.G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J. and Izquierdo, M.S. (2005) Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol B*, 142(4):410{418.

Gerster, H. (1998) Can adults adequately convert α -linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vit Nutr Res*, 68(3):159{173.

Gill, C.O., Hall, M.J. and Ratledge, C. (1977) Lipid-accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl Environ Microb*, 33(2):231{239.

Giraud, M.N., Motta, C., Boucher, D. and Grizard, G. (2000) Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod*, 15(10):2160{2164.

Gobillard MO (1996) The genome of the primitive eukaryote dinoflagellates: organization and functioning. *Zoological studies* 35:78-84

Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. (1993) Effect of various nutrient limitations on fatty-acid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotech*, 38(6):784{789.

Gurr MI, Harwood JL (1991) Lipid biochemistry, 4th ed. Chapman and Hall, London
 Harrington GW, Holz GG (1968) The monoenoic and docosaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. *Biochim Biophys Acta* 164:137-139

H.I. and Skiftesvik, A.B., (Eds), The Big Fish Bang, Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference, Institute of Marine Research, Bergen, Norway, pp. 249-256.

Hansen, H.S., Jensen, B. and von Wettstein-Knowles, P. (1986) Apparent in vivo retro-conversion of arachidonic acid to linoleic acid. *Biochim Biophys Acta*, 878(2):284-287.

Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar, Y. and Place, A.R. (2002) Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture*, 213(2):347-362.

Henderson RJ (1999) The production of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. *Lipid technologies* 11:5-10

Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet, & M. Schuelein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology* 3:722-726.

Teeri, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15:160-167.]

Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A. and Schwager, S.J. (2004) Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science*, 303:226-229.

Izquierdo, M.S. (1988) Essential fatty acid requirements for marine fish larvae. PhD thesis, La Laguna University, Spain, pp. 255.

Izquierdo, M.S. (1996) Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult Nutr*, 2(2):183-191.

Izquierdo, M.S. (2005) Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cah Options Mediterr*, 63:91-102.

Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H. and Tacon, A.G.J. (2001) Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1-4):25-42.

Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L. and Rosenlund, G. (2003) Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and fish quality. *Aquacult Nutr*, 9(6):397-407.

Izquierdo, Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. and Ginés, R. (2005) Alterations in profile of fatty acid profile and fresh qualifying gilthead seabream

(*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250:431-444.

J, O'Grady, J.A. MORGAN. Heterotrophic growth & lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 34, 121 (2010).

J. Folch, M. Lees, S. Sloane. *J Biol Chem*. 226 (1957) 497-509.

J. Lin, B. Pillay, S. Singh. *Biotechnol Appl Biochem*. 30 (1) (1999) 81-7.

Karl Erik Almin Karl-erik Eriksson Bo A. Pettersson Determination of the molecular weight distribution of cellulose on calibrated gel First published: October 1972 <https://doi.org/10.1002/app.1972.070161012>

Katsimpouras, G. Dedes, P. Bistis, D. Kekos, K.G Kalogiannis, E. Topakas E. *Bioresour Technol*. 270 (2018) 208-215.

Kemperman, R.F., Veurink, M., van der Wal, T., Kneegting, H., Bruggeman, R., Fokkema, M.R., Kema, I.P., Korf, J. and Muskiet, F.A. (2006)

Kendrick A, Ratledge C (1992) Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 27:15-20

Khaware, R.K., Koul, A. and Prasad, R. (1995) High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranifaciens*. *Biochem Mol Biol Int*, 4:875-880.

Kingsella, J.E., Lokesh, B., Broughton, S. and Whelan, J. (1990) Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition*, 6(1):24-62.

Klein, H.P. and Volkmann, C.M. (1975) Factors affecting palmitoylcoenzyme A desaturase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 124:718-723.

Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K. and Tandler, A. (2001) Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, 194(1-2):107-121.

Koven, W.M., Kissil, G.W. and Tandler, A. (1989) Lipid and n-3 requirements of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture*, 79:185-191.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J. (2002) Fish consumption, of fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(1):274-275.

Kris-Etherton, P.M., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G. and Etherton, T.D. (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr*, 71(1):179{188.

Kyle DJ (1997) Production and use of a single cell oil highly enriched in arachidonic acid. *Lipid Technol* 9:116-121

Lee YH, Fan LT (1982) Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* 24: 2383-2406.

Leman J (1997) Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Adv Appl Microbiol* 43:195-243

Lewis, N.M., Seburg, S. and Flanagan, N.L. (2000) Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry Sci*, 79(7):971{974.

Liang, Y.N., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009). "Biomass & lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic & mixotrophic growth conditions". *Biotechnology Letters*, vol. 31, pp.1043–1049).

Lichtenstein, A.H. (2003) Dietary fat and cardiovascular disease risk: quantity or quality? *J Women Health Gen B*, 12(2):109{114.

Liu, Jin Liu, Peipei Sun, Xiaonian Ma, Yue Jiang, ⊥ & Feng Chen* Δ Sesamol Enhances Cell Growth & the Biosynthesis & Accumulation of Docosahexaenoic Acid in the

Microalgal *Cryptocodinium conorii* 5645 Publication Date: May 28, 2015 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01441>

M.H Joe, J.Y Kim, S. Lim, D.H Kim, S. Bai, H. Park, S.G Lee, S.J Han, J.I Choi. *Biotechnol. Biofuels*. 8 (2015) 125.

Madsen, L., Rustan, A.C., Vaagenes, H., Berge, K., Dyroy, E. and Berge, R.K. (1999) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate reference. *Lipids*, 34(9):951{963.

Madsen, L., Rustan, A.C., Vaagenes, H., Berge, K., Dyroy, E. and Berge,

Mapemba, Lawrence D. & Epplin, Francis M., 2004. "Lignocellulosic Biomass Harvest and Delivery Cost," 2004 Annual Meeting, February 14-18, 2004, Tulsa, Oklahoma 34730, Southern Agricultural Economics Associatio

Martek Biosciences Corporation Boulder, Colorado, pp. 1{12. Barclay, W. and Zeller, S. (1996) Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J World Aquacult Soc*, 27(3):314{322.

Masuda, R. (2003) The critical role of docosahexaenoic acid in marine and terrestrial ecosystems: from bacteria to human behavior. In Browman, H.I. and Skiftesvik, A.B., (Eds), *The Big Fish Bang, Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference*, Institute of Marine Research, Bergen, Norway, pp. 249-256.

Masuda, R., Takeuchi, T., Tsukamoto, K., Ishizaki, Y., Kanematsu, M. and Imaizumi, K. (1998) Critical involvement of dietary docosahexaenoic acid in the ontogeny of schooling behaviour in the yellowtail. *J Fish Biol*, 53(3):471-484.

Mc Evoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G. and Sargent, J.R. (1995) Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, 134(1-2):101-112

McMillan, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*; Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1994; pp 292-324.

McMurry J (1988) *Organic chemistry*, 2nd ed. Brooks/Cole, Pacific Grove, California
Meesters PAEP, Eggink G (1996) Isolation and characterization of a $\Delta 9$ fatty acid desaturase gene from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CBS 570. *Yeast* 12:723-730

Meesters PAEP, Springer J, Eggink G (1997) Cloning and expression of the $\Delta 9$ fatty acid desaturase gene from *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 containing histidine boxes and acytochrome b5 domain. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:663-667

Mendes A, Guerra P, Madeira V, Ruano F, Silva TL, Reis A (2007a) Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptophodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulpas a promising carbon source. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1209-1215)

Mendes A, Guerra P, Vânia Madeira, Francisco Ruano Teresa Lopes da Silva Original Paper First Online: 24 January 2007) Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptophodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source Authors Authors & affiliations

Mendes, Teresa Lopes da Silva* and Alberto Reis, 2006 DHA Concentration & Purification from the Marine Heterotrophic Microalga *Cryptophodinium cohnii* CCMP 316 by Winterization & Urea Complexation Article in *Food Technology & Biotechnology* · April 2006

Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V. and Browse, J. (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 293:290-293.

Mourente, G. and Odriozola, J.M. (1990) Effect of broodstock diets on lipid classes and Meyer, F. and Bolch, K. (1963) Effect of temperatures on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utilis*. *Biochim Biophys Acta*, 77:671-673.
 their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Phys Bioch*, 8(2):93-101.

Müge Isleten-Hosoglu¹, Murat Elibol² Bioutilization of Cheese Whey & Corn Steep Liquor by Heterotrophic Microalgae *Cryptocodinium cohnii* for Biomass & Lipid Production *Akademik Gıda* 15(3) (2017) 233-241, DOI: 10.24323/akademik-gida.345256

Muller-Navarra, D.C., Brett, M.T., Liston, A.M. and Goldman, C.R. (2000) A highly-unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*, 403:74-77.

Muller-Navarra, D.C., Brett, M.T., Sangkyu, P., Chandra, S., Ballantyne, A.P., Zorita, E. and Goldman, C.R. (2004) Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 427(6969):69-72. Nakamura, M.T. and Nara, T.Y. (2003) Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals., 68(2):145-150.

Nakahara T, Yokochi T, Higashihara T, Tanaka S, Yagishi Y, Honda D (1996) Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acid by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *J Am Oil Chem Soc* 73:1421-1426

Nakayama, H., Mitsui, T., Nishihara, M. and Kito, M. (1980) Relation between growth temperature of *E. coli* and phase transition temperatures of its cytoplasmic and outer membranes. *Biochim Biophys Acta*, 601(1):1-10.

National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/13039>

Navarro, J.C., Amat, F. and Sargent, J.R. (1993) The lipids of the cysts of freshwater- and marine-type *Artemia*. *Aquaculture*, 109(3-4):327-336.

Naylor, R.L., Goldberg, J.H., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenko, J., Mooney, H. and Troell, M. (2000) Effect of aquaculture in world fish supplies. *Nature*, 405:1017-1024.

Nettleton, J.A. (1991) Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J Am Diet Assoc*, 91(3):331-337.

O'Mara, C.J. (1998) U.S. oil seed industry looks at trade issues. *Inform*, 9:132-136.

Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C., and Cowey, C.B. (1975). Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Lipids*, 10(9):528-531.

Park, H.G., Puvanendran, V., Kellett, A.P., Christopher, C. and Brown, J.A.(2006) Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES J Mar Sci*, 63(2):285-295.

Parveen Kumar, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, Pieter Stroeve. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis & Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009, 48, 3713–3729

Pereira H. *Cork: Biology, Production and Uses* 1st Edition ,Hardcover
ISBN: 9780444529671 eBook ISBN: 9780080476865 Imprint: Elsevier Science
Published Date: 29th March 2007 Page Count: 346

Perez, J.; Dorado, J. M.; Rubia, T. D.; Martinez, J. Biodegradation & biological treatment of cellulose, hemicellulose & lignin: An overview. *Int. Microbiol.* 2002, 5, 53–63.

Peyou-Ndi, M.M., Watts, J.L. and Browse, J. (2000) Identification and characterization of an animal Δ^6 -fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 376(2):399-408.

Preez JC du, Immelman M, Kock JFL, Kilian SG (1995) Production of γ -linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. *Biotechnol letters* 17:933-938

Rabinovich, A.R. and Ripatti, P.O. (1991) On the conformational, physical properties and functions of polyunsaturated acyl chains. *Biochim Biophys Acta*, 1085(1):53-62. Dekker, Inc., Basel, New York, pp. 351-400.

Ratledge, C. (2002b) Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *BioChem Soc Trans*, 30:1047-1050.

Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86:807-815.

Ratledge, C. and Wynn, J.P. (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-51.

Reddy AS, Thomas TL (1996) Expression of cyanobacterial Δ^6 -desaturase gene results in γ -linolenic acid production in transgenic plants. *Nature Biotechnol* 14:639-642

Ristic, V. and Ristic, G. (2003) Role and importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the prevention and therapy of atherosclerosis. *Medicinski Pregled*, 56(1-2):50-53.

- Ritar, A.J., Dunstan, G.A., Nelson, M.M., Brown, M.R., Nichols, P.D., Thomas, C.W., Smith, E.G., Crear, B.J. and Kolkovski, S. (2004) Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture*, 239(1{4}):351{373}.
- Rodríguez C, Pérez JA, Badía P, Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Hernández L (1998) Then-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169:9-23
- Rodriguez^{abc} J.A.Perez^{abc}A.Lorenzo^{abc}M.S. Izquierdo^{abc}J.R.Cejas^{abc} (1994b) N-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream (*Sparus au-rata*) when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comp BiochemPhysiol A*, 107(4):693{698}.
- Roux, M.P., Kock, J.L.F., du Preez, J.C. and Botha, A. (1995) The influence of dissolved oxygen tension on the production of cocoa butter equivalents and α -linolenic acid by *Mucor circinelloides*. *Syst Appl Microbiol*, 18(3):329{334}.
- Saito, H., Ishihara, K. and Murase, T. (1997) The fatty acid composition in tuna (*bonito*, *Euthynnus pelamis*) caught at three different localities from tropics to temperate. *J Sci Food Agric*, 73(1):53{59}.
- Sanders, T.A. (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr*, 71(1):176{178}.
- Sargent, J.R., Mc Evoy, L.A. and Bell, J.G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine ally necessary alternative to meat. *P Nutr Soc*, 58(2):377{383}.
- Information circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, 196(8):1025{1037}.
- Shepherd, C.J., Pike, I.H. and Barlow, S.M. (2005) Sustainable feed resources of marine origin. In: *Aquaculture Europe 2005*, EAS Special Publication, 35:59{66}.
- Shields, R.J. and Irwin, S. (1998) Preliminary evaluation of the Schizochytrium-based products, Algamac-3010 and Schizotein, as diet enrichments for Atlantic halibut larvae. Technical report, Aquafauna Bio-Marine Inc., Algyll, UK.
- Sijtsma, L. and de Swaaf, M.E. (2004) Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotech*, 64(2):146{153}.
- Sijtsma, L., Springer, J., Meesters, P.A.E.P., de Swaaf, M.E. and Eggink, G. (1998) Recent advances in fatty acid synthesis in oleaginous yeast and microalgae. *Recent Res Dev Microbiol*, 2:219{232}.

Simopoulos, A.P. (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*, 70(3):560{569.

Simopoulos, A.P. (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*, 21(3):495{505.

Singh A, Ward OP (1996) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Traustochytrium roseum* ATCC 20810. *J Indust Microbiol* 16:370-373

Singh, A., Wilson, S. and Ward, O.P. (1996) Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892. *World J Microbiol Biotech*, 12(1):76{81.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. and Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored rare biosphere. *World J Microbiol Biotech*, 103(32):12115{12120.

Sonnenborn U, Kunay WH (1982) Purification and properties of the fatty acid synthetase complex from the marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *Biochim Phys Acta* 712:523-534

Sontrop, J. and Campbell, M.K. (2006) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence and a methodological critique. *Prev Med*, 42(1):4{13.

Sprecher H (1981) Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res* 20:13-22

Sprecher, H. (2002) The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostag Leukotr Ess*, 67(2{3}):79{83.

Sprecher, H.I., Luthria, D., Mohammed, B.S. and Baykousheva, S.P. (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 36(12):2471{2477.

Springer C. (2005) Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24–C28 polyunsaturated fatty acids

Stauffer CE (1996) *Fats and oils*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota Storey KB, Bailey E (1978) Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of the adult cockroach, *Periplaneta*. *Insect Biochem* 8:125-131

Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* 2002, 83, 1–11.).

Techno-economic Analysis for the Thermochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol via Acetic Acid Synthesis Y Zhu SB Jones April 2009).

Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease Dariush Mozaffarian, M.D., M.P.H., Martijn B. Katan, Ph.D., Alberto Ascherio, M.D., Dr.P.H., Meir J. Stampfer, M.D., Dr.P.H., and Walter C. Willett, M.D., Dr.P.H. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2 Volumes, 2nd Edition Elhadi M. Yahia (Editor) ISBN: 978-1-119-15794-6

Trautwein. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 103 (2001) 45–55.

Tuttle RC, Loeblich AR (1975) An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Phycologia* 14:1-8

W H Freeman; 2002. Biochemistry. 5th edition. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. New York, ISBN-10: 0-7167-3051-0

W. Safdar, M. Shamoan, X. Zan, J. Haider, H.R Sharif, M. Shoaib, Y. Song. *AMB Expr* (2017) 7:85

Wada H, Gombos Z, Murata N (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347:200-203
Ward O (1995) Microbial production of long chain pufas. *INFORM* 6:684-688

Watanabe, T., Kitajimab, C. and Fujitab, S. (1983) Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aqua-culture*, 34(1{2}):115{143.

Wynn J, Behrens P, Sundararajan A, Hansen J, Apt K (2005) Production of single cell oils by dinoflagellates. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) *Single cell oils*. AOCS press, Illinois, pp 86–98

X. Li, G. Pei, L. Liu, L. Chen, W. Zhang. *Biores. Technol.* 235 (2017) 87–95

Xu, H., Miao, X.L. & Wu, Q.Y. (2006). "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters". *Journal of Biotechnology*, vol. 126, pp.499–507).

Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T. and Higashihara, T. (1997) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J Am Oil Chem Soc*, 74:1431{1434.

Yavin, E., Brand, A. and Green, P. (2002) Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress. *Nutr Neurosc*, 5(3):149{157.

Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimisation of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72-76

Z. Chi, D. PYLE, Z. WEN, C. FREAR, S. CHEN. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.*, 42, 1537 (2007)

Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossman, A.R. and Apt, K.E. (2001) Trophic obligate conversion of a photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292(5524):2073-2075.

Zheng, X. Ma, Z. Gao, Y. Wan, M. Min, W. Zhou, Y. Li, Y. Liu, H. Huang, P. Chen, R. Ruan. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177 (2015) 662-674.