

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**“ Τα μικροφύκη ως πηγή λίπους και λιπαρών οξέων στις
ιχθυοτροφές ”**

Κόκκαλη Μαρία-Ελένη

Βόλος 2017

**“ Τα μικροφύκη ως πηγή λίπους και λιπαρών οξέων στις
ιχθυοτροφές”**

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Επίκουρος Καθηγητής – Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων,
- 2) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το πέρας αυτής της κοπιαστικής δουλειάς, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη προσπάθεια διεξαγωγής του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και την κ. Π. Παναγιωτάκη για τις χρήσιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Πιέρ Ψωφάκη που ήταν παρών καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας έρευνας δίνοντας μου τις συμβουλές και τη βοήθεια του, και την διδακτορική φοιτήτρια κ. Μαρία Μετσοβίτη που στο πλάι της έγιναν όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις που παρουσιάζονται στην παρούσα έρευνα και μαζί με τα αποτελέσματα που θα δοθούν αποτελούν κομμάτι της διδακτορικής της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την αγάπη και τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου, τους φίλους μου και στον σύντροφό μου Νίκο για την άπλετη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων εμπύχωση και πίστη σε μένα και τις δυνατότητες μου καθ' όλη την πενταετή φοίτηση μου στο τμήμα.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα διπλωματική εργασία στον φίλο μας Μιχάλη Τριανταφύλλου, ο οποίος αν και έφυγε νωρίς, το γέλιο του ηχεί στα αυτιά μας κάνοντας τον να ζει για πάντα στις καρδιές μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν μια βιβλιογραφική επισκόπηση αναφορικά με τη χρήση των μικροφυκών ως εναλλακτικές πηγές λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές. Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται το ζήτημα της χρήσης των ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές και τις εναλλακτικές πηγές φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ιχθυοτροφών σήμερα. Επιπλέον, αναλύονται οι κύριες ομάδες μικροφυκών και οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν για να αναπτυχθούν. Επίσης γίνεται αναλυτική περιγραφή της σύστασης μικροφυκών σε μακροθρεπτικά συστατικά και λιπαρά οξέα, και ο ρόλος τους στην βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας. Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων που έγιναν στα είδη *Botryococcus braunii* και *Chlorella vulgaris* με διάφορες μεθόδους εκχύλισης, διαλύτη και χρόνου εκχύλισης, με σκοπό την επίδραση αυτών των παραμέτρων στην αποδοτικότητα της εκχύλισης των ολικών λιπών των ειδών.

Λέξεις κλειδιά: Μικροφύκη, *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, PUFA, HUFA, λίπη και λιπαρά οξέα, ιχθυοτροφές, ιχθυέλαια, αειφόρα ιχθυοκαλλιέργεια

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Λίπη και λιπαρά οξέα	2
1.1 Λιπίδια	2
1.2 Λιπαρά οξέα.....	4
1.3 Προσδιορισμός ολικών λιπών	8
1.3.1 Εκχύλιση λίπους με τη μέθοδο Folch et al. (1957).....	9
1.3.2 Εκχύλιση λίπους με τη μέθοδο Soxhlet.....	10
1.4 Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων και προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Πηγές λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές.....	13
2.1 Ο τομέας των υδατοκαλλιέργειών	13
2.2 Λίπη στις ιχθυοτροφές.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μικροφύκη.....	23
3.1 Γενικά.....	23
3.2 Κύριες ομάδες φυκών	26
3.3 Παράμετροι ανάπτυξης μικροφυκών	33
3.4 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών	37
3.5 Θρεπτική αξία μικροφυκών	40
3.6 Σύσταση μικροφυκών σε λιπαρά οξέα	43
3.7 Ο ρόλος των μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Προσδιορισμός λίπους και λιπαρών οξέων σε επιλεγμένα είδη μικροφυκών	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Συμπεράσματα	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59
ABSTRACT.....	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Λίπη και λιπαρά οξέα

1.1 Λιπίδια

Με βάση τη διαλυτότητα, ως λιπίδια ορίζονται οργανικά μόρια, που απαντούν στη φύση και μπορούν να απομονωθούν κατά την εκχύλιση κυττάρων και ιστών με υδρόφοβους οργανικούς διαλύτες (McMurry 2005).

Τα λιπίδια ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες:

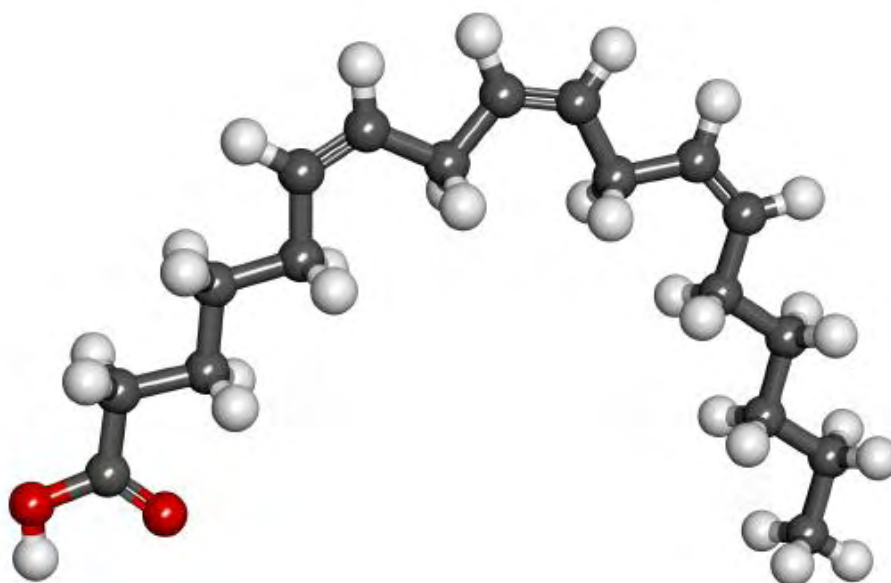
1. Σε αυτά που περιέχουν εστερομάδες που μπορούν να υδρολυθούν (λίπη, κηροί)
2. Σε αυτά που δεν περιέχουν εστερομάδες και δεν υδρολύονται (χοληστερόλη, στεροειδή) (McMurry 2005).

Τα ψάρια χρειάζονται τα λιπίδια ως πηγή διαθέσιμης ενέργειας, ως δομικά στοιχεία των μεμβρανών, ως φορείς των λιποδιαλυτών βιταμινών, ως πρόδρομα των εικοσανοειδών, των ορμονών και της βιταμίνης D και ως ενζυμικούς συμπαράγοντες (Higgs & Dong 2000, Turchini *et al.* 2009). Στα ψάρια, τα λιπίδια αποτελούν πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων με σκοπό τη διατήρηση της καλής υγείας, της σωστής ανάπτυξης του σώματος, της αναπαραγωγής και των λοιπών λειτουργιών του σώματος. Όλοι οι σπονδυλωτοί οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, έχουν υψηλές απαιτήσεις σε ω-3 και σε ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA). Τα τελευταία χρόνια, ο ρόλος των λιπιδίων στη διατροφή των ψαριών έχει γίνει πιο σημαντικός λόγω της παραγωγής και της εφαρμογής σιτηρεσίων υψηλής περιεκτικότητας σε ενέργεια (Turchini *et al.* 2009). Αυτό ωφελεί όχι μόνο τον εκτροφέα, καθώς μειώνεται η περίοδος εκτροφής, αλλά ταυτόχρονα και το περιβάλλον (Sargent *et al.* 2002). Οι βιολογικά ενεργές μορφές των απαραίτητων λιπαρών οξέων είναι γενικά οι C20 και C22 μεταβολίτες του λινολεϊκού οξέος (LA: 18:2n-6) (Εικόνα 1) και α-λινολενικού οξέος (ALA:18:3n-3)

(Εικόνα 2). Το ιχθυέλαιο παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως η κύρια πηγή λίπους στις εμπορικές τροφές των ψαριών, κυρίως λόγω της αφθονίας των απαραίτητων λιπαρών οξέων σε αυτό το προϊόν.



Εικόνα 1: Λινολεϊκό οξύ (LA), (<http://commons.wikimedia.org>)



Εικόνα 2: α -Λινολενικό οξύ (ALA), (<http://commons.wikimedia.org>)

1.2 Λιπαρά οξέα

Από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των λιπιδίων είναι οι υδροφοβικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται κυρίως στα δομικά συστατικά των λιπιδίων, τα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είναι αλυσίδες υδρογονανθράκων διαφόρων μηκών και βαθμών κορεσμού, οι οποίες απολήγουν σε καρβοξυλικές ομάδες. Η συστηματική ονοματολογία για ένα λιπαρό οξύ προκύπτει από το όνομα του αρχικού υδρογονάνθρακα με αλλαγή της κατάληξης από -ιο σε -ικό. Παραδείγματος χάριν, το κορεσμένο λιπαρό οξύ με δεκαοκτώ άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του (C18) καλείται δεκαοκτανικό οξύ, διότι ο αρχικός υδρογονάνθρακας καλείται δεκαοκτάνιο. Ένα C18 λιπαρό οξύ με έναν διπλό δεσμό καλείται δεκαοκτενικό οξύ, με δύο διπλούς δεσμούς δεκαοκταδιενικό οξύ και με τρεις διπλούς δεσμούς δεκαοκτατριενικό οξύ. Ο συμβολισμός 18:0 υποδηλώνει λιπαρό οξύ C18 χωρίς διπλούς δεσμούς, ενώ ο συμβολισμός 18:2 δηλώνει ότι υπάρχουν δύο διπλοί δεσμοί (Berg *et al.* 2001).

Τα άτομα άνθρακα του λιπαρού οξέος αριθμούνται αρχίζοντας από το τελικό καρβοξύλιο. Τα άτομα στις θέσεις 2 και 3 ονομάζονται συχνά α και β αντίστοιχα. Το πλέον απομακρυσμένο άτομο άνθρακα ονομάζεται και άτομο ω-άνθρακα. Η θέση του διπλού δεσμού δηλώνεται με το σύμβολο Δ με έναν εκθέτη. Π.χ., cis-Δ9 σημαίνει ότι υπάρχει ένας διπλός δεσμός cis μεταξύ των ατόμων 9 και 10, ενώ trans-Δ2 σημαίνει ότι υπάρχει ένας διπλός δεσμός trans μεταξύ των ατόμων 2 και 3. Εναλλακτικά, η θέση του διπλού δεσμού μπορεί να υποδειχθεί με αρίθμηση από τον πιο απομακρυσμένο άνθρακα (Berg *et al.* 2001).

Οι κυριότεροι φυσιολογικοί ρόλοι των λιπαρών οξέων είναι :

1. Είναι δομικά συστατικά φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων.
2. Πολλές πρωτεΐνες τροποποιούνται με την ομοιοπολική δέσμευση λιπαρών οξέων, τα οποία τις καθοδηγούν στις θέσεις τους στις μεμβράνες.

3. Είναι καύσιμα μόρια. Αποθηκεύονται ως τριακυλογλυκερόλες (ή τριγλυκερίδια), οι οποίες είναι μη φορτισμένοι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Οι τριακυλογλυκερόλες κινητοποιούν λιπαρά οξέα, τα οποία οξειδώνονται, για να καλύψουν ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου ή του οργανισμού.

4. Παράγωγα των λιπαρών οξέων χρησιμεύουν ως ορμόνες και ως ενδοκυτταρικοί αγγελιαφόροι (Berg *et al.* 2001).

Τα λιπαρά οξέα που χορηγούνται με την τροφή στα εκτρεφόμενα ψάρια περιλαμβάνουν τα πολυακόρεστα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα (Καραπαναγιωτίδης 2016). Παρακάτω ακολουθεί ο Πίνακας 1 με τα κυριότερα λιπαρά οξέα που απαντώνται στους ιστούς των ιχθύων και των καρκινοειδών.

Πίνακας 1: Τα κυριότερα λιπαρά οξέα των ιχθύων και των καρκινοειδών (Καραπαναγιωτίδης 2011)

Χημικός Τύπος	Κοινό Όνομα	Συντομογραφία
<u>Κορεσμένα λιπαρά οξέα</u>		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Λαουρικό	12:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Μυριστικό	14:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Πενταδεκυλικό	15:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Παλμιτικό	16:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Στεαρικό	18:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Αραχιδικό	20:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	Βεχενικό	22:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Λιγνοκερικό	24:0
<u>Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα</u>		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Παλμιτολεϊκό	16:1ω-7
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ολεϊκό	18:1ω-9
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Βατσενικό	18:1ω-7
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Γονδοϊκό	20:1ω-11
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Γαδολεϊκό	20:1ω-9
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Κετολεϊκό	22:1ω-11
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	Ερουκικό	22:1ω-9
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Νερβονικό	24:1ω-9
<u>Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα</u>		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Λινολεϊκό	18:2ω-6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	γ-λινολενικό	18:3ω-6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Δίχωμο γ-λινολενικό	20:3ω-6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Αραχιδονικό	20:4ω-6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	Αδρενικό	22:4ω-6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Δοκοσαπενταενοϊκό	22:5ω-6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	λινολενικό ή λινολενικό	18:3ω-3
$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Στεαριδονικό	18:4ω-3
$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Εικοσαπενταενοϊκό	20:5ω-3
$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Κλουπανοδονικό	22:5ω-3
$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Κερβονικό	22:6ω-3

Επιπλέον, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συμβάλλουν και στη φυσιολογική λειτουργία πολλών νευροορμονικών μηχανισμών (Bhathena 2000, Tanskanen *et al.* 2001, Young & Conquer 2005).

Τέλος, το τελικό επίπεδο ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέος επηρεάζεται από τις ικανότητες του οργανισμού (γενετικά προκαθορισμένες) να βιοσυνθέτει το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ από πρόδρομες ενώσεις, μικρότερης αλυσίδας και να καταβολίζει τόσο την πρόδρομη ένωση όσο και το τελικό προϊόν. Αυτές οι ιδιαιτερότητες καθιστούν αναγκαία την πλήρη κατανόηση του μεταβολισμού των λιπιδίων, γεγονός που κεντρίζει διαρκώς το επιστημονικό ενδιαφέρον (Sargent *et al.* 2002).

Παρά το γεγονός ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα, τα σπονδυλωτά αδυνατούν να συνθέσουν ενδογενώς και επομένως τα λαμβάνουν από την τροφή τους. Στα ψάρια η βιοχημική σύνθεση των λιπαρών οξέων εξαρτάται από το κάθε είδος καθώς και από το τύπο του ψαριού δηλαδή αν είναι γλυκού ή θαλασσινού νερού. Τα ψάρια της θάλασσας έχουν υψηλότερες ποσοτικές απαιτήσεις σε ω-3 από ότι σε ω-6 (Καραπαναγιωτίδης 2017). Επίσης, η Θερμοκρασία του νερού φαίνεται να επηρεάζει τις απαιτήσεις των ειδών σε απαραίτητα λιπαρά οξέα. Γενικά, τα ψυχρόφιλα είδη έχουν υψηλότερες απαιτήσεις σε ω-3 από ότι σε ω-6 συγκριτικά με τα είδη των εύκρατων και τροπικών περιοχών που έχουν υψηλότερες απαιτήσεις σε ω-6. Περαιτέρω, τα σαρκοφάγα είδη γενικά έχουν υψηλότερες ποσοτικές απαιτήσεις σε ω-3 συγκριτικά με τα εκείνα του γλυκού νερού (Καραπαναγιωτίδης 2017).

Στην πραγματικότητα, οι ιχθύες και τα καρκινοειδή δεν μπορούν να συνθέσουν το 18:2ω-6 (λινελαϊκό οξύ) και 18:3ω-3 (α-λινολενικό οξύ), που αποτελούν τα βραχείας αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Καραπαναγιωτίδης 2017). Ωστόσο, ορισμένα

είδη, αλλά όχι όλα, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν ενδοσωματικά τα βραχείας αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (18:2 ω -6 και 18:3 ω -3) που προσέλαβαν από την τροφή τους στα μακράς αλυσίδας ω -6 και ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (δηλαδή 20:4 ω -6 και 20:5 ω -3, 22:6 ω -3, αντίστοιχα), μέσω προσθήκης ατόμων άνθρακα («επιμήκυνση» της ανθρακικής αλυσίδας) και προσθήκης διπλών δεσμών («αποκορεσμός» της ανθρακικής αλυσίδας) (Καραπαναγιωτίδης 2017).

Η ενδοσωματική μετατροπή του 18:2 ω -6 οδηγεί σε «βιοσύνθεση» πολυακόρεστου λιπαρού οξέος μόνο της σειράς ω -6 (δηλ. 20:4 ω -6), ενώ η μετατροπή του 18:3 ω -3 οδηγεί σε βιοσύνθεση πολυακόρεστου λιπαρού οξέος μόνο της σειράς ω -3 (δηλ. 20:5 ω -3, 22:6 ω -3) (Καραπαναγιωτίδης 2017).

1.3 Προσδιορισμός ολικών λιπών

Ο προσδιορισμός των ολικών λιπών ενός δείγματος βασίζεται στην εκχύλιση με διαλύτες χαμηλής πολικότητας και γίνεται κυρίως με δύο μεθόδους: την υγρή μέθοδο (μέθοδος Folch *et al.* 1957) και την ξηρή μέθοδο (μέθοδος Soxhlet). Για τον προσδιορισμό των ολικών λιπών των μικροφυκών έχουν χρησιμοποιηθεί και οι δύο μέθοδοι, με τη μέθοδο Folch *et al.* (1957) και ειδικότερα χρησιμοποιώντας διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλης 1:1 (v/v) να θεωρείται η πλέον αποδοτικότερη στην εκχύλιση μιας και τα μικροφύκη περιέχουν μεγάλο ποσοστό πολικών λιπών (Ramluckan *et al.* 2014).

1.3.1 Εκχύλιση λίπους με τη μέθοδο Folch *et al.* (1957)

Η εκχύλιση του ολικού λίπους από μικροφύκη με τη συγκεκριμένη μέθοδο εκχυλίζει όλες τις λιπιδικές ομάδες εκτός από πολύ-φωσφοινοσιτίδια. Σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με καπάκι, προστίθεται 1g δείγματος και ζυγίζεται μέχρι το 4ο δεκαδικό ψηφίο. Έπειτα, προστίθεται 16 ml διαλύτη χλωροφορμίου : μεθανόλης C:M (2:1 v/v), και το δείγμα ομογενοποιείται για 2 λεπτά. Το δείγμα αφήνεται για 1 ώρα σε πάγο για να εξασφαλιστεί η ολοκληρωτική εκχύλιση. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml διαλύματος χλωριούχου καλίου 0,88% (w/v) σε απεσταγμένο νερό ώστε C:M:υδατικό διάλυμα 8:4:3 (v/v/v). Το διάλυμα ανακινείται έντονα και έπειτα αφήνεται για 5 λεπτά στο πάγο. Σταδιακά θα αρχίσει να δημιουργείται μια υποκείμενη λιποδιαλυτή φάση πλούσια σε χλωροφόρμιο που θα περιέχει το λίπος, και μια υπερκείμενη υδατική φάση πλούσια σε μεθανόλη που θα περιέχει όλα τα λιποδιαλυτά συστατικά. Το διάλυμα, κατόπιν, φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 1500 rpm έτσι ώστε να γίνει πλήρης ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η ανώτερη φάση (υδατική φάση) απομακρύνεται προσεκτικά με μία μικροπιπέτα και σε κάθε σωλήνα απομένει η λιποδιαλυτή φάση. Έπειτα, η απομείνουσα λιποδιαλυτή φάση φιλτράρεται σε νέο προ ζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Κατόπιν, ο διαλύτης εξατμίζεται κάτω από ελευθέρου-οξυγόνου άζωτο στον απαγωγό. Ο δοκιμαστικός σωλήνας ζυγίζεται και το ολικό λίπος προσδιορίζεται βαρομετρικά. Τέλος, στο σωλήνα με το αποξηραμένο λίπος προστίθεται μια ποσότητα C:M 2:1 που περιέχει 0,01% BHT (0,01% w/v) ώστε να δίνει μια σταθερή συγκέντρωση 10 mg λίπους ανά ml διαλύματος, Το BHT προστίθεται ώστε να προστατεύσει το λίπος από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών του οξέων. Το διάλυμα κατόπιν μεταφέρεται με μικροπιπέτα σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο φλασάρεται με καθαρό άζωτο και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την μελλοντική του χρήση.

1.3.2 Εκχύλιση λίπους με τη μέθοδο Soxhlet

Ο προσδιορισμός των ολικών λιπαρών ουσιών στα μικροφύκη με μέθοδο εκχύλισης Soxhlet (AOAC 1995) χρησιμοποιεί γυάλινα δοχεία εκχύλισης όπου προστίθενται 6 πέτρες βρασμού και καταγράφεται το βάρος τους σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στην συνέχεια στα δοχεία εφαρμόζονται χάρτινοι ηθμοί όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα. Ζυγίζεται ποσότητα δείγματος βάρους 2g και μεταφέρεται στο χάρτινο δοχείου ηθμού. Το δείγμα ενδείκνυται να είναι αποξηραμένο και λεπτοαλεσμένο. Η ξήρανση πραγματοποιείται σε φούρνο στους 105°C για περίπου 24h (μέχρι σταθεροποίησης του βάρους του δείγματος). Στο γυάλινο δοχείο εκχύλισης προστίθενται 140ml πετρελαϊκού αιθέρα, στον οποίο εμβαπτίζονται τα χάρτινα δοχεία ηθμού με το δείγμα. Τα γυάλινα δοχεία εκχύλισης μαζί με τους χάρτινους ηθμούς μεταφέρονται σε ειδική συσκευή εκχύλισης λιπαρών ουσιών (συσκευή Soxhlet). Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, τα δείγματα θερμαίνονται στους 150 °C υπό την παρουσία του οργανικού διαλύτη, όπου λαμβάνει χώρα το πρώτο στάδιο της εκχύλισης. Έπειτα, ο οργανικός διαλύτης απορροφάτε και εκπλύνεται στο δείγμα για 1,5h, όπου λαμβάνει χώρα το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης. Κατόπιν, ο διαλύτης απορροφάται πλήρως με αποτέλεσμα τα ολικά λιπίδια του δείγματος να παραμένουν στον πάτο του δοχείου εκχύλισης. Για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων πετρελαικού αιθέρα τα δοχεία (χωρίς τους χάρτινους ηθμούς) μεταφέρονται σε φούρνο για 15min στους 65°C. Στην συνέχεια, τα γυάλινα δοχεία τοποθετούνται σε αφυγραντήρα μέχρις απόκτησης σταθερού βάρους και στη συνέχεια επαναζυγίζονται. Το καθαρό βάρος των ολικών λιπαρών ουσιών δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Ολικά λιπίδια \%} = (W(\text{g})_{\text{τελικό δοχείο εκχύλισης}} - W(\text{g})_{\text{αρχικό δοχείο εκχύλισης}}) * 100$$

1.4 Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων και προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία

Για τον προσδιορισμό της σύστασης σε λιπαρά οξέα ενός δείγματος, είναι απαραίτητο να ετοιμαστούν τα πτητικά παράγωγα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Η συνηθέστερη μέθοδος μεθυλεστεροποίησης λιπαρών οξέων σε βιολογικά δείγματα είναι η μεθυλεστεροποίηση μέσω καταλυόμενης με οξύ μετεστεροποίησης. Έτσι 1mg ολικού λίπους δείγματος τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με καπάκι. Προστίθεται 0,1 mg καθαρού επταδεκανοϊκού οξέος (17:0) ως εσωτερικός δείκτης και το δείγμα ανακινείται. Το διάλυμα εξατμίζεται κάτω από ελεύθερο-οξυγόνου άζωτο και ο διαλύτης απομακρύνεται. Προστίθενται 2 ml αντιδραστηρίου μεθυλεστεροποίησης μεθανόλης-θεικού οξέος (1% θειικό οξύ σε μεθανόλη κατά όγκο v/v) και 1 ml τολουένης ώστε να βοηθηθεί η διάλυση των ουδέτερων λιπαρών ομάδων. Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινείται ισχυρά ώστε να αναμειχθούν τα διαλύματα και φλασάρεται με άζωτο. Ο σωλήνας τοποθετείται στους 50°C σε μία θερμοκοιτίδα και αφήνεται για 16 ώρες. Στο σωλήνα τοποθετείται ένα κομμάτι χαρτιού μεταξύ αυτού και του καπακιού για την αποφυγή της εκτίναξης του τελευταίου κατά τη θέρμανση. Ο σωλήνας απομακρύνεται από τη θερμοκοιτίδα και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σωλήνα προστίθενται 2 ml από 2% (w/v) KHCO_3 , 1 ml ισοεξάνη:διεθυλεθέρα (1:1 v/v) το οποίο περιέχει 0,01% (w/v) BHT, και 4 ml ισοεξάνη:διεθυλεθέρα (1:1 v/v). Ο σωλήνας ανακινείται και ανακατεύεται και έπειτα φυγοκεντρείται στους 1500 rpm για 2 λεπτά. Το άνω οργανικό τμήμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα. Ακόμη 5 ml ισοεξάνη:διεθυλεθέρα (1:1

v/v) προστίθενται στον αρχικό σωλήνα, ανακινούνται και φυγοκεντρούνται εκ νέου. Το άνω οργανικό τμήμα μεταφέρεται στο νέο σωλήνα όπως πριν, και ο διαλύτης εξατμίζεται κάτω από ελεύθερου-οξυγόνου άζωτο. Το ξηρό εκχύλισμα του σωλήνα αποτελεί τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων του δείγματος του ολικού λίπους (FAME). Το FAME διαλύεται σε 100 μl ισοεξάνης και ανακινείται.

Η σύνθεση λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων προσδιορίζεται συνήθως μέσω αέριας χρωματογραφίας των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ως κινητή φάση ένα αέριο (φέρον αέριο), το οποίο συνήθως είναι άζωτο, αργό ή υδρογόνο, και ως σταθερή φάση είτε μία στερεή (αέρια-στερεή χρωματογραφία, Gas Solid Chromatography, GSC), είτε μία υγρή ουσία (αέρια-υγρή χρωματογραφία, Gas Liquid Chromatography, GLC). Πιο συχνή εφαρμογή έχει η δεύτερη, δηλαδή η αέρια-υγρή χρωματογραφία. Στην τεχνική της αέριας-υγρής χρωματογραφίας ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και του φέροντος αερίου (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός οφείλεται στις διαφορετικές δυνάμεις συγκράτησης και έκλυσης μεταξύ των συστατικών του μείγματος και του υλικού πλήρωσης της στήλης κατά τη ροή του φέροντος αερίου.

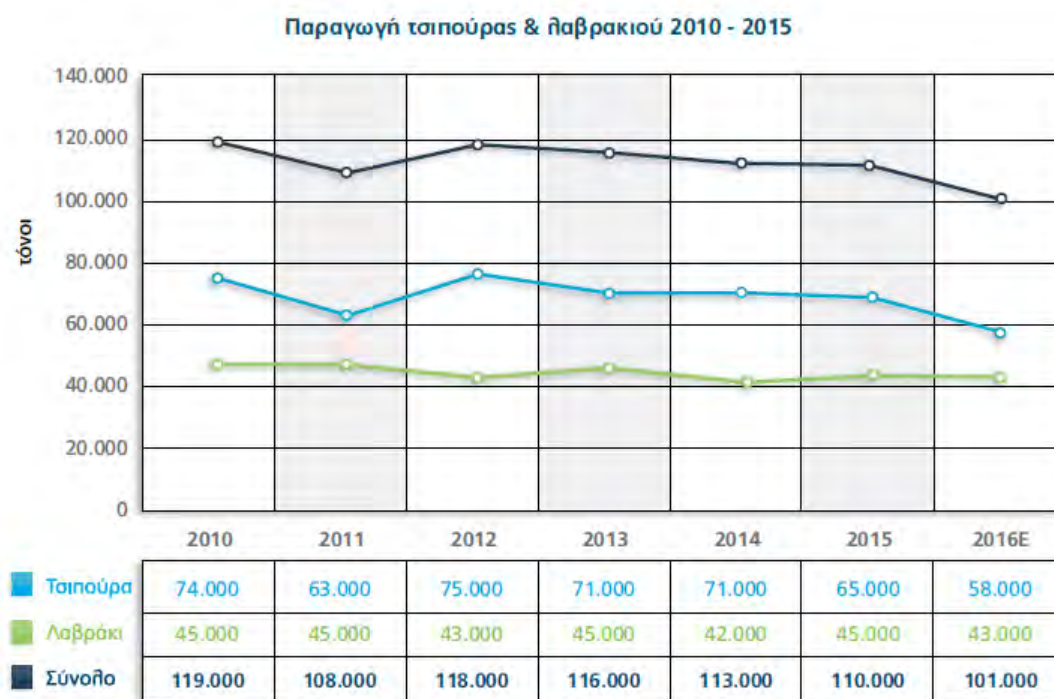
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Πηγές λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές

2.1 Ο τομέας των υδατοκαλλιέργειών

Η βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας αποτελεί μέχρι σήμερα τον γρηγορότερα αναπτυσσόμενο τομέα παραγωγής τροφίμων, αυξανόμενη με ένα μέσο ετήσιο ρυθμό 8,9% από το 1950 έως το 2004 (FAO 2007). Η παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια το 2015 παρήγαγε περίπου 76,6 εκατομμύρια τόνους θαλασσινών προϊόντων αξίας πάνω από US\$157,9 δισεκατομμυρίων (FAO 2017). Τα ψάρια υδατοκαλλιέργειας αποτελούν περίπου το 50% όλων των ψαριών που καταναλώνονται παγκοσμίως και αυτό το ποσοστό προβλέπεται να συνεχίζει να αυξάνει ως αποτέλεσμα της μείωσης της παραγωγής από τη συλλεκτική αλιεία και της αυξανόμενης κατανάλωσης θαλασσινών προϊόντων. Η παραγωγή από τη συλλεκτική αλιεία δεν προβλέπεται να αυξηθεί και η υδατοκαλλιέργεια καλείται να καλύψει τις ανάγκες σε θαλασσινά προϊόντα ενός αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού.

Οι υδατοκαλλιέργειες συμβάλουν σημαντικά στον πρωτογενή τομέα της Ελλάδας. Είναι ένας πολύ δυναμικός κλάδος που συνεισφέρει ουσιαστικά στην Εθνική Οικονομία της χώρας. Σήμερα, η Ελλάδα έρχεται δεύτερη στην παραγωγή τσιπούρας λαβρακιού παγκοσμίως πίσω από την πρωτοπόρα Τουρκία (ΣΕΘ 2016), έχοντας ωστόσο απωλέσει προσφάτως την ηγέτιδα θέση που διατηρούσε εδώ και δύο δεκαετίες. Από τη δεκαετία του '80 και μετά παρατηρείται σημαντική ενασχόληση με την εκτροφή κυρίως του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και αυτό λόγω των κατάλληλων κλιματικών συνθηκών, της εκτεταμένης και προστατευόμενης ακτογραμμής, της τεχνολογικής ανάπτυξης σε τομείς όπως η διατροφή και η εκκόλαψη των ψαριών, αλλά και λόγω διεθνών και Ευρωπαϊκών χρηματικών επενδύσεων στον τομέα (Ευρωπαϊκή Ένωση 2017). Στην

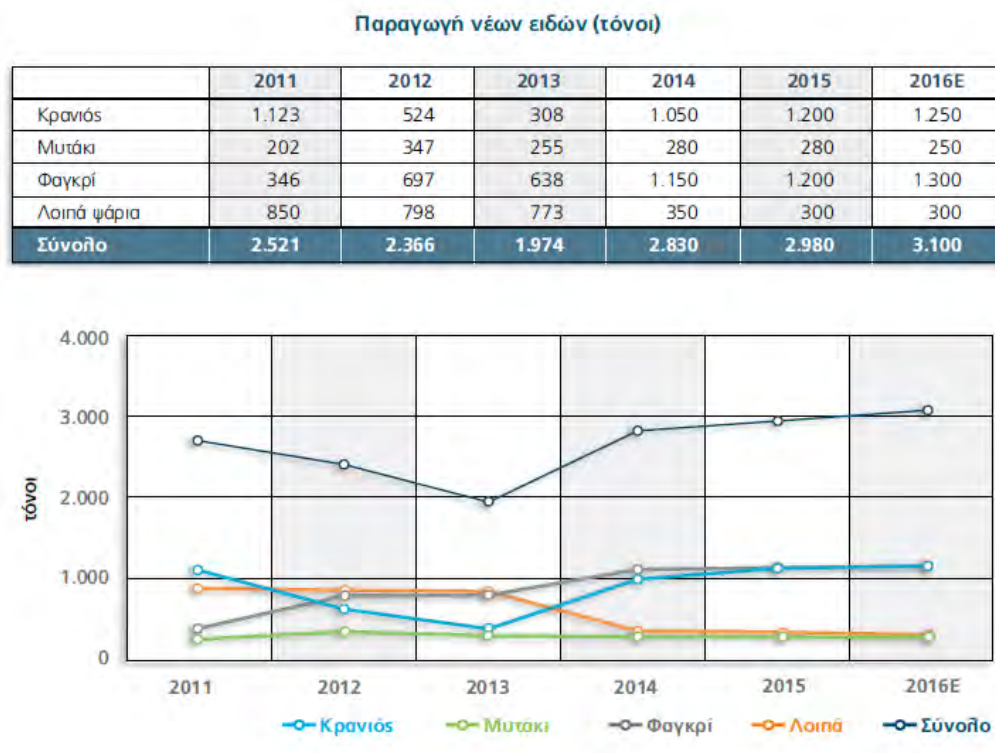
Εικόνα 3 παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή της τσιπούρας και του λαβρακιού στην Ελλάδα, από το 2010 έως το 2015 (ΣΕΘ 2016).



Εικόνα 3. Διακύμανση περιόδου 2010-2016 της ετήσιας παραγωγής (σε τόνους) της τσιπούρας και του λαβρακιού στην Ελλάδα (ΣΕΘ 2016)

Η ελληνική ιχθυοκαλλιεργητική παραγωγή έχει αναπτύξει την εκτροφή με νέα θαλάσσια είδη όπως το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), τη συναγρίδα (*Dentex dentex*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*), το σαργό (*Diplodus sargus*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*) και τη γλώσσα (*Solea solea*) και πρόσφατα τον κρανιό (*Argyrosomus regius*). Στα γλυκά νερά αν και η συνολική ιχθυοκαλλιεργητική παραγωγή είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με εκείνη της θαλάσσιας καλλιέργειας, είδη όπως ο οξύρρυγχος (οικογένεια Acipenser), το χέλι (*Anguilla anguilla*), και η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) αποτελούν τους κύριους εκπροσώπους εκτρεφόμενων ειδών

εσωτερικών υδάτων. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή νέων ειδών ανά είδος στην Ελλάδα, από το 2011 καθώς και προβλέψεις για το 2016 (ΣΕΘ 2016).



Εικόνα 4. Διακύμανση ετήσιας παραγωγής νέων ειδών (σε τόνους) στην Ελλάδα για την περίοδο 2011-2016, (ΣΕΘ 2016).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της ελληνικής παραγωγής υδρόβιων οργανισμών εξάγεται κυρίως στην Ιταλία και στην Ισπανία με ποσοστά 50% και 14% αντίστοιχα (ΣΕΘ 2016). Τα εκτρεφόμενα ψάρια, και κυρίως το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*), είναι το δεύτερο σημαντικότερο εξαγόμενο αγροτικό προϊόν, μετά τα φρούτα και τα λαχανικά (FAO 2013). Από το 1990 οι περισσότερες ελληνικές επιχειρήσεις έχουν καταφέρει να πιστοποιήσουν τα προϊόντα τους (ISO 9001 και HACCP), γεγονός που επικροτεί την εμπιστοσύνη των καταναλωτών (FAO 2013).

2.2 Λίπη στις ιχθυοτροφές

Τις τελευταίες δεκαετίες η ραγδαία αύξηση των ιχθυοκαλλιεργειών με την εντατικοποίηση της παραγωγής είχε ως αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένη ζήτηση για βιομηχανικά παρασκευασμένες ιχθυοτροφές. Η σίτιση των εκτρεφόμενων ψαριών με ισόρροπα και υψηλής θρεπτικής αξίας σιτηρέσια είναι απαραίτητη για την παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Έτσι, οι ειδικοί επιστήμονες και η βιομηχανία ιχθυοτροφών εστιάζουν στην αναζήτηση κατάλληλων πρώτων υλών για τον καταρτισμό εξειδικευμένων και διατροφικά ισορροπημένων σιτηρεσίων που διασφαλίζουν τη βέλτιστη ανάπτυξη και αύξηση, την υγεία και την ευζωία των ψαριών, στηριζόμενοι πάντα στη γνώση της φυσιολογίας θρέψης κάθε είδους ξεχωριστά, των φυσικών διατροφικών συνηθειών του, των θρεπτικών αναγκών και των ιδιαιτεροτήτων του, όσον αφορά στην πεπτικότητα της τροφής.

Τα ψάρια χρησιμοποιούν τα λίπη ως κύρια πηγή ενέργειας τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες εκτροφής, όσο και σε περιόδους έντονης καταπόνησης, κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (μακροχρόνια ενεργειακή απαίτηση), αλλά και σε περιόδους σίτισης με τροφές χαμηλής ενεργειακής αξίας. Η σύγχρονη τάση στις ιχθυοτροφές χαρακτηρίζεται από μια προσπάθεια αύξησης των επιπέδων χορήγησης των λιπιδίων στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ψαριών ώστε να γίνεται αποτελεσματικότερη κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα σιτηρέσια (φαινόμενο “διατήρησης πρωτεϊνών”).

Τα διαθέσιμα λίπη και έλαια που χρησιμοποιούνται στα σιτηρέσια προέρχονται κυρίως από διάφορα είδη ψαριών και ονομάζονται ιχθυέλαια, αλλά και από φυτά, και ονομάζονται φυτικά έλαια. Τα ιχθυέλαια παρασκευάζονται παράλληλα με τα ιχθυάλευρα, είναι υψηλής διατροφικής αξίας, και είναι πλούσια σε ω-3 PUFA. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του 2006, οι ιχθυοτροφές χρησιμοποιούσαν παλαιότερα το

87% των παγκόσμιων αποθεμάτων του ιχθυελαίου ως πηγή λίπους (Tacon *et al.* 2006). Στοιχεία του 2012 που παρέχονται από τον Παγκόσμιου Οργανισμού Γεωργίας και Τροφίμων (FAO) και τον Διεθνή Οργανισμό Ιχθυαλεύρων και Ιχθυελαίων (IFFO, International Fishmeal and Fish Oil Organization) δείχνουν πως οι υδατοκαλλιέργειες συνεχίζουν να είναι ο κύριος καταναλωτής (περίπου το 88%) των παγκόσμιων αποθεμάτων των ιχθυελαίων (Tacon & Metian 2008). Το 2006 η παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών και καρκινοειδών των 23,85 εκατομμυρίων τόνων κατανάλωσε 25,36 εκατομμύρια τόνους ιχθυοτροφών που περιείχαν 0,83 εκατομμύρια τόνους ιχθυελαίου που αντιστοιχούν σε 16,6 εκατομμύρια τόνους πελαγικών ψαριών (Tacon & Metian 2008). Η παραγωγή του ιχθυελαίου από τη συλλεκτική αλιεία ανήλθε σε 0,99 εκατομμύρια τόνους το 2006 (Turchini *et al.* 2009). Επίσης, πρόσφατα αρχίζει να αυξάνει η ζήτηση του ιχθυελαίου και από τις βιομηχανίες παραγωγής άλλων τροφίμων, προκειμένου να βελτιώσουν την ποιότητα των προϊόντων που καταναλώνονται από τον άνθρωπο ή τα αγροτικά ζώα.

Τα τελευταία τριάντα χρόνια η ετήσια παραγωγή ιχθυελαίου δεν έχει ξεπεράσει τους 1,5 εκατομμύρια τόνους ανά έτος (Turchini *et al.* 2009) με αποτέλεσμα το κόστος προμήθειας αυτών να έχει εκτιναχθεί την τελευταία δεκαετία, εκτινάσσοντας παράλληλα το κόστος των ιχθυοτροφών και της ίδιας της παραγωγής. Επομένως η γρήγορα αυξανόμενη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας δεν μπορεί να συνεχίζει να βασίζεται στα αποθέματα θαλάσσιων πελαγικών ψαριών για τη προμήθεια ιχθυελαίου. Μάλιστα, ο Διεθνής Οργανισμός Ιχθυάλευρων και Ιχθυελαίων (IFFO) προβλέπει περαιτέρω μείωση της παραγωγής του ιχθυελαίου, επιδεινώνοντας τη δραματική κατάσταση των διαθέσιμων αποθεμάτων ιχθυελαίου (Tacon & Metian 2008).

Στην αγορά της Βορειοδυτικής Ευρώπης η τιμή του ιχθυελαίου αυξήθηκε από 314 US\$ ανά τόνο το 1999 σε 812 US\$ ανά τόνο το 2006 (Turchini *et al.* 2009). Σύμφωνα με στοιχεία που δίνονται από τον FAO (Μάρτιος, 2010) η παραγωγή ιχθυελαίου μειώθηκε το 2010, λόγω φαινομένου El Niño αλλά και του σεισμού στη Χιλή, που προκάλεσε καταστροφές στη βιομηχανία της. Σύμφωνα με στοιχεία του FAO (Globefish 2013), η τιμή του ιχθυελαίου στο τελευταίο τρίμηνο του 2012 ανήλθε στα US\$2183/t, η οποία είναι 43% αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του ιχθυελαίου κατά το τελευταίο τρίμηνο του 2011.

Παρά το υψηλό κόστος του ιχθυελαίου, οι παραγωγοί ιχθυοτροφών συνεχίζουν να χρησιμοποιούν αυτό το προϊόν για την παρασκευή των ιχθυοτροφών, θεωρώντας ότι είναι η καλύτερη πηγή λίπους για την εκτροφή των ψαριών, ιδιαίτερα των θαλάσσιων σαρκοφάγων ειδών. Ο IFFO (Chamberlain 2011) προτείνει τη χρήση του ιχθυελαίου μόνο για τις ιχθυοτροφές στην αρχή (γόνος) και στο τέλος της εκτροφής των ψαριών, καθώς και των γεννητόρων. Το κύριο χαρακτηριστικό του ιχθυελαίου είναι το υψηλό επίπεδο των ω-3 ακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (Highly unsaturated fatty acids, HUFA), που είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητα για την καλή ανάπτυξη και υγεία των εκτρεφόμενων ψαριών. Όμως αυτή η κατάσταση δεν αναμένεται να συνεχισθεί εξαιτίας πολλών παραγόντων. Πέρα από τους οικονομικούς λόγους της αύξησης των τιμών του ιχθυελαίου και των περιορισμένων αποθεμάτων, η βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας υφίσταται έντονη κριτική από τους επιστήμονες και τις περιβαλλοντικές ομάδες σχετικά με τη μακροπρόθεσμη αειφορία των αλιευτικών αποθεμάτων (Naylor *et al.* 2000, Worm *et al.* 2006). Η ηθική της χρήσης αλιευτικών πηγών, και κυρίως πελαγικών ψαριών, για ζωικές τροφές αντί για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση, είναι επίσης ένα θέμα παγκόσμιας συζήτησης και σχετικές πολιτικές αρχίζουν να αναπτύσσονται (FAO 2007).

Το κόστος, λοιπόν, των ιχθυοτροφών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη βιωσιμότητα του κλάδου. Η μειωμένη διαθεσιμότητα ιχθυελαίων και το υψηλό κόστος αποτελούν τροχοπέδη για τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών, τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα. Οι ανάγκες σε ιχθυέλαιο συνεχώς αυξάνονται ακολουθώντας τη μέχρι σήμερα συνεχή ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών. Η αειφόρος ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών που βασίζεται στην εξεύρεση νέων εναλλακτικών πηγών λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές αποτελεί πρωτεύοντα στόχο του κλάδου παγκοσμίως, αλλά και Ευρωπαϊκά (Horizon) και Εθνικά (Ε.Π.ΑΛ. 2014-2020).

Για τους λόγους αυτούς, υπάρχει άμεσα μεγάλη ανάγκη στη βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας να βρει και να εφαρμόσει εναλλακτικές πηγές λίπους. Η πρόκληση για την παραγωγή ψαριών είναι να διατηρήσει ή και να βελτιώσει τα αναγνωρισμένα πλεονεκτήματα των ψαριών για την υγεία του ανθρώπου, ενώ συγχρόνως να μεγιστοποιήσει την αειφορία, την υγεία των ψαριών και τα οικονομικά οφέλη. Η προσπάθεια για αντικατάσταση των ιχθυελαίων με άλλες πηγές, επικεντρώθηκε εδώ και δύο δεκαετίες στα φυτικά έλαια (ανασκόπηση από Turchini *et al.* 2009) με ιδιαίτερα ωφέλιμα αποτελέσματα τόσο ως προς την επιτυχία αντικατάστασης των ιχθυελαίων στα σιτηρέσια όσο και ως προς τη βελτίωση της οικονομικότητας και της περιβαλλοντικής αειφορίας του κλάδου. Αντίθετα με την παραγωγή του ιχθυελαίου, η οποία έχει μείνει στατική τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, η παραγωγή φυτικών ελαίων (VO) έχει αυξηθεί σημαντικά. Η παγκόσμια παραγωγή φυτικών ελαίων εκτιμήθηκε σε πάνω από 115 εκατομμύρια τόνους το 2005 (MPOB 2005) και η παραγωγή τους συνεχίζει να αυξάνει ετησίως. Η μέση ετήσια τιμή του ιχθυελαίου για το 2013 ανέρχεται στα US\$2.257,86, ενώ του ελαίου ελαιοκράμβης στα US\$1.134,71 (FAO 2013). Προβλέπεται ότι αυτή η διαφορά των τιμών μπορεί

και να αυξηθεί, με το ιχθυέλαιο να δέχεται υψηλή ζήτηση από τη βιομηχανία των ιχθυοτροφών και συγχρόνως η παγκόσμια παραγωγή του να μειώνεται. Οι τιμές των φυτικών ελαίων αυξάνουν τα τελευταία χρόνια λόγω αυξημένων αναγκών για ανθρώπινη κατανάλωση αλλά και της αναπτυσσόμενης βιομηχανίας βιο-αερίου. Όμως γενικά η αύξηση στις τιμές των φυτικών ελαίων είναι γενικά χαμηλότερη από εκείνη στις τιμές των ιχθυελαίων.

Τα φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές προέρχονται από ιδιαίτερα ελαιούχους σπόρους όπως ο λιναρόσπορος (λινέλαιο), η σόγια (σογιέλαιο), η ελαιοκράμβη (έλαιο ελαιοκράμβης), το φοινικέλαιο κ.ά. Η περιεκτικότητα ελαίων όπως και η σύνθεση σε λιπαρά οξέα διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα το είδος του φυτικού ελαίου.

Η πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι τα φυτικά έλαια εύκολα καταβολίζονται από τα ψάρια ως πηγές ενέργειας για την ανάπτυξη (Bell *et al.* 2001, Stubhaug *et al.* 2007). Επομένως, μεγάλη ποσότητα ιχθυελαίου που χρησιμοποιείται στις ιχθυοτροφές μπορεί να αντικατασταθεί με φυτικά έλαια, που είναι περισσότερο διαθέσιμα και μικρότερου σχετικά κόστους. Όμως, τα χημικά χαρακτηριστικά των φυτικών ελαίων, και ιδιαίτερα η σύστασή τους σε λιπαρά οξέα, θέτουν περιορισμούς σε αυτές τις εναλλακτικές λύσεις λίπους. Η βιοδιαθεσιμότητα και η πεπτικότητα όλων των θρεπτικών συστατικών μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά λόγω κάποιων αντιδιατροφικών ουσιών που περιέχονται στα φυτικά προϊόντα. Έτσι, οι υποκαταστάσεις ελλοχεύουν τον κίνδυνο μείωσης πολύτιμων ιχνοστοιχείων και βιταμινών που έχουν συνδεθεί με την υψηλή διατροφική αξία των ιχθύων, όπως οι βιταμίνες B12, D, και E, τα καροτενοειδή, το ιώδιο και το σελήνιο (Καραπαναγιωτίδης 2011).

Τα περισσότερα φυτικά έλαια είναι σχετικά φτωχές πηγές των ω-3 λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το θαλάσσιο ιχθυέλαιο. Τα απαραίτητα ω-3 PUFA, και ιδιαίτερα τα EPA και DHA, για την ανάπτυξη και την υγεία των ψαριών απουσιάζουν από όλα τα φυτικά έλαια. Τα φυτικά έλαια είναι πλούσια σε ω-6 και ω-9 λιπαρά οξέα, κυρίως LA και ολεϊκό (OA, 18:1n-9), με εξαίρεση το λινέλαιο (LO, linseed oil), το σογιέλαιο και το κραμβέλαιο, τα οποία είναι πλούσια σε 18:ω-3 (ALA). Ανάλογα με το είδος, τα ψάρια έχουν διάφορες ικανότητες της βιομετατροπής του 18:ω-3 σε ω-3 HUFA (Sargent *et al.* 2002), αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις, ιδιαίτερα στα θαλάσσια σαρκοφάγα είδη, όπως το λαβράκι και η τσιπούρα, η ποσότητα των ω-3 HUFA που παράγεται *in vivo* είναι ανεπαρκής για να ικανοποιήσει τη καλή ανάπτυξη και υγεία των ψαριών. Οι πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι σημαντική ποσότητα του ιχθυελαίου μπορεί να αντικατασταθεί με φυτικά έλαια στις τροφές αρκετών ειδών ψαριών χωρίς να επηρεάσει την ανάπτυξη και την αξιοποίηση της τροφής, με την προϋπόθεση ότι επαρκείς ποσότητες των απαραίτητων λιπαρών οξέων παρέχονται στο σιτηρέσιο (Καραπαναγιωτίδης 2011). Τα επίπεδα αυτά διαφοροποιούνται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος, το στάδιο ανάπτυξης κ.λπ.

Άλλες νέες εναλλακτικές πηγές λίπους είναι έλαια από καλλιέργειες μονοκύτταρων μικροφυκών, και κωπήποδων. Όμως η διαθεσιμότητα αυτών των ελαίων είναι πολύ περιορισμένη και το κόστος παραγωγής πολύ υψηλό. Η εφαρμογή της βιοτεχνολογίας για γενετικά τροποποιημένα φυτά για την παραγωγή ελαίων πλούσιων σε ω-3 HUFA δείχνει υποσχόμενα αποτελέσματα (Myhr & Dalmo 2005). Όμως, γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί θεωρούνται ότι είναι απειλή για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία (Myhr & Dalmo 2005). Τα λίπη από τα υποπροϊόντα μονογαστρικών αγροτικών ζώων αποτελούν μία φθηνή διαθέσιμη πηγή

για τη βιομηχανία των ιχθυοτροφών, όμως η σύσταση τους που είναι πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και φτωχά σε ω-3 PUFA περιορίζει τη χρήση τους.

Τα υποπροϊόντα των ψαριών στις μονάδες μεταποίησης, θεωρούνταν ως χαμηλής αξίας και επομένως αποβάλλονταν. Όμως, λόγω των οικονομικών και περιβαλλοντικών πλεονεκτημάτων της χρησιμοποίησης τέτοιων υποπροϊόντων, μερικές χώρες χρησιμοποιούν τα υποπροϊόντα αλιείας και υδατοκαλλιέργειας για την παραγωγή θαλάσσιων προϊόντων, όπως ιχθυάλευρα. Τα υποπροϊόντα των ψαριών, κυρίως τα εντόσθια, επίσης έχουν μεγάλη δυνατότητα για χρήση στη παραγωγή ιχθυελαίου για την εκτροφή των ψαριών (Mondal *et al.* 2006, Faul *et al.* 2007).

Από τα ανωτέρω γίνεται σαφής η επιτακτική ανάγκη εύρεσης πηγών για την αντικατάσταση του ιχθυελαίου. Επίσης, από την παράθεση των πιθανών πηγών προκύπτει ότι τα φυτικά έλαια και γενικά οι εναλλακτικές πηγές λίπους αποτελούν τις μόνες ρεαλιστικές και οικονομικές λύσεις για την αντικατάσταση του ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές. Στην παρούσα μελέτη γίνεται προσπάθεια ανασκόπησης της χρήσης των μικροφυκών ως εναλλακτικές πηγές λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Μικροφύκη

3.1 Γενικά

Τα φύκη (algae) είναι φωτοσυνθετικοί φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν βλαστούς, φύλλα, ρίζες, δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς όπως τα ανώτερα φυτά. Αντίθετα, έχουν πρωτόγονη οργάνωση, πολύ απλή στις κατώτερες ταξινομικά ομάδες, πιο πολύπλοκη στις ανώτερες. Σχηματίζουν σπόρια αντί σπερμάτων. Ορισμένα έχουν πολύπλοκους βιολογικούς κύκλους. Διαφέρουν πολύ τόσο από τα χερσαία όσο και από τα θαλάσσια Σπερματοφύτα, (αυτά που εσφαλμένα συχνά αποκαλούνται «φύκια»). Από πλευράς μορφολογίας υπάρχει εξαιρετική ποικιλία. Υπάρχουν απλές μονοκύτταρες μορφές, αποικιακές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς έως πολύπλοκες διακλαδισμένες ή μη. Ορισμένα μοιάζουν με μικροσκοπικούς θάμνους, με τσαμπιά σταφυλιού, άλλα μοιάζουν με φύλλα, δίχτυ, σωλήνες, κ.ά.

Τα φύκη διακρίνονται σε μικροφύκη και σε μακροφύκη. Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικά, αόρατα με γυμνό μάτι, όπως για παράδειγμα αυτά που συμμετέχουν στο φυτοπλαγκτό, που αποκαλούνται συλλογικά μικροφύκη. Άλλα είναι ορατά με γυμνό μάτι ή και μεγάλων διαστάσεων που φθάνουν αρκετά μέτρα μήκος όπως για παράδειγμα τα μεγάλα Φαιοφύκη, που συλλογικά τα αποκαλούμε μακροφύκη (Ρουσομουστακάκη και συν. 2007).

Τα φύκη, κυρίως τα μικροσκοπικά, συναντώνται παντού. Ιδιαίτερα στα νερά, γλυκά και αλμυρά, θάλασσες, λίμνες, ποτάμια. Ορισμένα, μικροσκοπικά, έχουν προσαρμοστεί και ζουν στο έδαφος, σε βράχους, πέτρες, ξύλα, ακόμα και σε ψυχρές ή θερμές ερημικές περιοχές. Τα μεγάλων διαστάσεων φύκη βρίσκονται στη θάλασσα. Ορισμένα φαιοφύκη σχηματίζουν πραγματικά θαλάσσια δάση. Στη θάλασσα

αναπτύσσονται κυρίως πάνω σε σταθερά υποστρώματα, δηλαδή σε βράχους, σε ύφαλα πλοίων κ.ά. όπου προσκολλώνται με ένα χαρακτηριστικό όργανο, το δίσκο προσκόλλησης, ή με αποφύσεις που θυμίζουν ρίζες (Ρουσσομουστακάκη και συν. 2007).

Τα μικροφύκη περιλαμβάνουν κοκκοειδείς, μαστιγωτές, ή παλμελοειδείς μορφές και τριχώματα, αλλά και μεγάλους αποικιακούς σχηματισμούς με νήματα, μικροθαλλούς ή πιο περίπλοκες συσσωματώσεις. Μαζί με τα μακροφύκη που διαβιούν στην παραλιακή ζώνη, το φυτοπλαγκτόν και τα βενθικά μικροφύκη του εύφωτου πυθμένα, αποτελούν τους κύριους (ενίοτε μοναδικούς) πρωτογενείς παραγωγούς στην θάλασσα ή στα εσωτερικά ύδατα (Falkowski 1980, Reynolds 2006) καθώς και σε ακραία περιβάλλοντα, όπως οι θερμοπηγές (Brock 1967) ή οι παγετώνες (Bunt & Wood 1963). Εν ολίγοις, αποτελούν την βάση διατροφής για το 70 % της γήινης παραγωγής βιομάζας (Andersen 1996), ενώ ευθύνονται περίπου για το 50 % της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου (Wiessner et al. 1995). Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων (Jassby 1988) και έχει ευρέως τεκμηριωθεί στην παραδοσιακή και την σύγχρονη υδατοκαλλιέργεια (Guedes & Malcata 2012, De Pauw & Persoone 1988).

Στα υδάτινα περιβάλλοντα, τα φύκη αναπτύσσονται ως βένθος, περίφυτο ή φυτοπλαγκτό. Το βένθος απαρτίζουν φύκη τα οποία προσκολλώνται σε κάποιο υπόστρωμα και αναπτύσσονται στον πυθμένα ή τα τοιχώματα μιας υδατολεκάνης. Ως περίφυτο χαρακτηρίζονται τα φύκη τα οποία προσκολλώνται σε υδατική βλάστηση (επίφυτο στην περίπτωση που προσκολλώνται στο εξωτερικό του υδατικού φυτού και ενδόφυτο στην περίπτωση που ζουν στο εσωτερικό του). Το φυτοπλαγκτό απαρτίζεται από φύκη τα οποία κινούνται παθητικά ή αιωρούνται στο υδάτινο μέσο. Ανάλογα με το μέγεθός του διακρίνεται σε μακροπλαγκτό (>200 μm), μικροπλαγκτό

(20-200 μm), nanoplankton (10-20 μm), ultraplankton (2-10 μm) και picoplankton (0,2-2 μm) (Lee 1999).

Τα μικροφύκη εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Αυτά είναι η ευκολία στην καλλιέργειά τους, στον χειρισμό τους, στην πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών τους και στην παραγωγή διάφορων τοξινών, η χρήση των οποίων φαίνεται να είναι ευρεία στον τομέα της ιατρικής και της φαρμακευτικής. Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε παγκόσμιο επίπεδο κυρίως ως ζωντανή τροφή στις υδατοκαλλιέργειες αλλά και για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, κατά το πλείστον υψηλής αξίας και αφορούν προϊόντα τροφής, κοσμετολογίας, φαρμακευτικής χρήσης, και γενικά βιομηχανική χρήση. Αρκετά είδη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας, ως τροφής και συμπληρωμάτων διατροφής, παραγωγή με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, λιπαρών οξέων (EPA, DHA, GLA), βιταμινών, ανόργανων στοιχείων κ.λπ. Πολλοί από τους μεταβολίτες των φυκών έχουν φαρμακευτική αξία, είτε επειδή είναι αντιοξειδωτικά, είτε επειδή ενισχύουν το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων, είτε επειδή έχουν ιστατική δράση. Τα κυριότερα στελέχη που καλλιεργούνται ανήκουν στα γένη *Chlorella*, *Dunaliella*, *Arthrospira*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Haematococcus* και *Schizochytrium* (Brennan & Owende 2010, Harun et al. 2010, Pulz & Gross 2004). Τα μικροφύκη επίσης καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων για γενική βιομηχανική χρήση. Τα σημαντικότερα προϊόντα είναι διάφορες χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, φυκοκυανίνη, καροτενοειδή (π.χ. ασταξανθίνη, β -καροτένιο) κ.λπ.

Επίσης μια σημαντική εφαρμογή των φυκών είναι η παραγωγή λιπασμάτων και εδαφοβελτιωτικών προϊόντων. Η χρήση μικροφυκών ως εδαφοβελτιωτικού παράγοντα είναι μια πρακτική που εφαρμοζόταν σε παλαιότερες εποχές. Επίσης τα

φύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα αργής αποδέσμευσης (slow release) και ειδικά τα αζωτοδεσμευτικά (nitrogen-fixing) είδη όπως τα *Anabaena* και *Nostoc*, τα οποία δεσμεύουν το άζωτο από την ατμόσφαιρα και την μετατρέπουν σε οργανική μορφή εντός της βιομάζας τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λιπασμάτων με σαφώς πιο ήπιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε σχέση με την τυπική διαδικασία παραγωγής αζωτούχων λιπασμάτων μέσω της διεργασίας Haber–Bosch (Grewe & Pulz 2012, Razon 2012, Pulz et al. 2008, Spolaore et al. 2006).

3.2 Κύριες ομάδες φυκών

Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria, Cyanophyceae, Blue green algae).

Τα Κυανοφύκη ή Κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που δε φέρουν σχηματοποιημένους πυρήνες, χλωροπλάστες και άλλα χαρακτηριστικά ευκαρυωτικού κυττάρου. Αποτελούν βασική ομάδα του φυτοπλαγκτού, ιδιαίτερα των γλυκών νερών. Σήμερα κατατάσσονται στα φωτοσυνθετικά βακτήρια (Κυανοβακτήρια), συχνά όμως αναφέρονται όπως και παλαιότερα ως φύκη (Κυανοφύκη), ιδιαίτερα σε οικολογικές έρευνες. Περιλαμβάνουν περίπου 2.000 είδη.

Διάτομα (Bacillariophyta ή Diatomeae).

Ευκαρυωτικοί, μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι ή αποικιακοί οργανισμοί με χαρακτηριστικό πυριτικό κυτταρικό τοίχωμα (θήκη) με ανάγλυφες διακοσμήσεις. Η θήκη των διατόμων αποτελείται από δύο, περίπου ίσα, τμήματα (θυρίδες) που συνδέονται μεταξύ τους και εφαρμόζουν σαν «κουτί». Χαρακτηρίζονται είτε από ακτινωτή, είτε από αμφίπλευρη συμμετρία. Η συμμετρία και οι χαρακτηριστικές

ποικιλίες του κυτταρικού τοιχώματος αποτελούν συστηματικά γνωρίσματα που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό αυτών των φυκών. Περιλαμβάνουν περίπου 16.000 είδη.

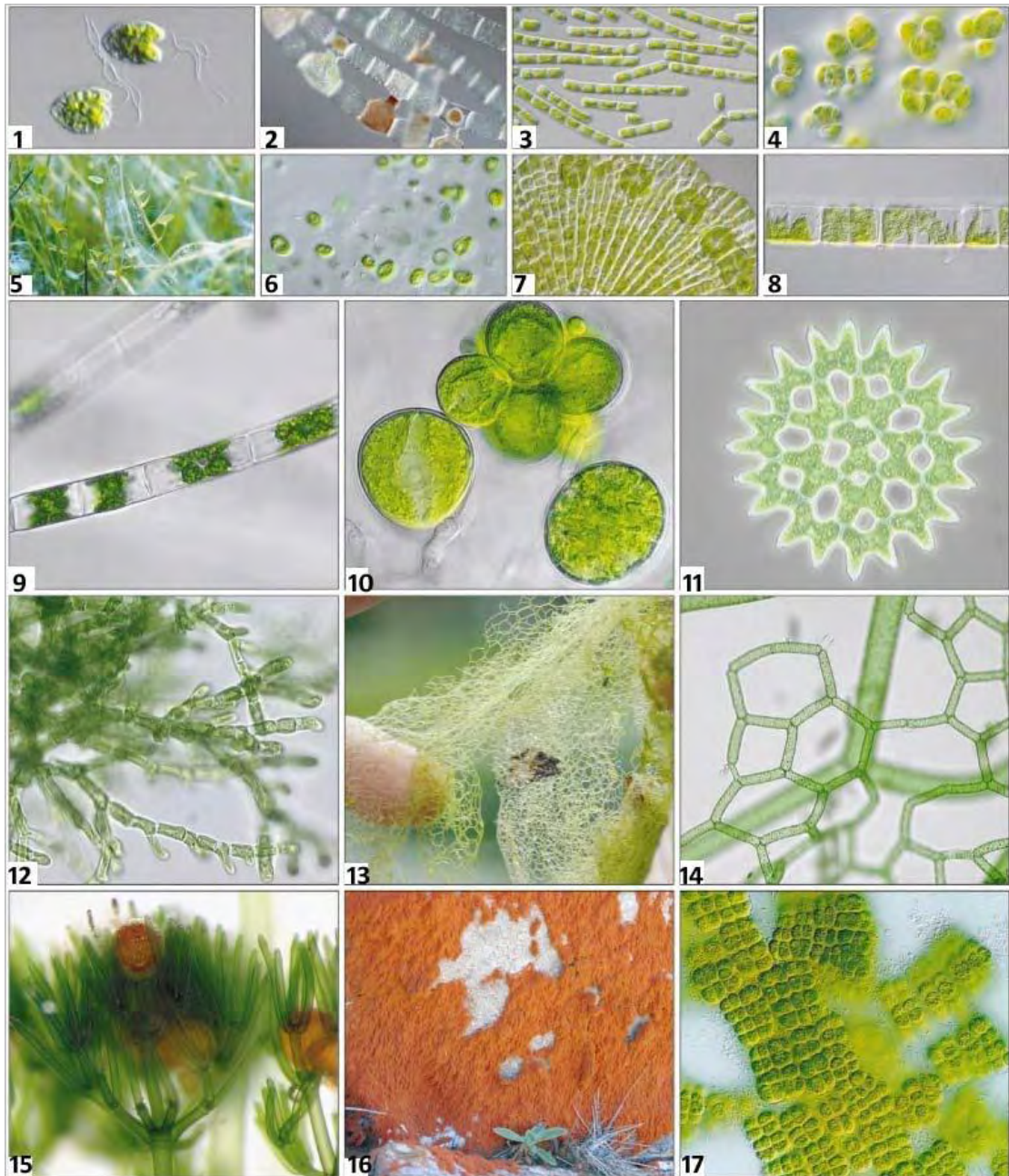
Δινοφύκη, Δινομαστιγωτά, Πυροφύκη (Dinophyceae, Dinoflagellates).

Μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, κινητοί με τη βοήθεια μαστίγιων. Το κυτταρικό τους σώμα περικλείεται από κυτταρινούχο θήκη, η οποία σε πολλές περιπτώσεις σχηματίζεται από σκληρές πλάκες που διαφέρουν στη μορφή και στις διακοσμήσεις. Τα περισσότερα Δινοφύκη έχουν στο κύτταρό τους δυο αυλάκια μέσα στα οποία κινείται από ένα μαστίγιο. Είναι από τους πιο συνηθισμένους μικροσκοπικούς οργανισμούς του φυτοπλαγκτού. Το όνομά τους Πυροφύκη το οφείλουν στο ότι μερικά είδη παράγουν αναλαμπές φωτός (βιοφωτισμός) ενώ άλλα όταν αναπτυχθούν μαζικά δίνουν ένα κοκκινωπό χρώμα στη θάλασσα (ερυθρά παλίρροια). Συμβάλλουν στην πρωτογενή παραγωγή (παραγωγή οργανικής ύλης από αυτότροφους οργανισμούς). Η μαζική τους ανάπτυξη μπορεί να προκαλέσει προβλήματα λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν τοξίνες. Περιλαμβάνουν περίπου 800 είδη. Τα περισσότερα είναι θαλάσσια πλαγκτικά ενώ περίπου 100 ζουν αποκλειστικά σε γλυκά νερά.

Χλωροφύκη (Chlorophyta, Chlorophyceae, Green algae).

Τα Χλωροφύκη είναι μια μεγάλη ομάδα με περισσότερα από 500 γένη και 8.000 είδη (Εικόνα 5). Περιλαμβάνει μικροφύκη και μακροφύκη. Τα κύτταρά τους είναι ευκαρυωτικά, φέρουν σχηματοποιημένο πυρήνα, ένα ή περισσότερους χλωροπλάστες και πυρηνοειδή. Υπάρχουν διάφοροι μορφολογικοί τύποι, κινητοί με ένα έως πολλά μαστίγια, ή ακίνητοι, μικροσκοπικοί ή ορατοί με γυμνό μάτι, αποικιακοί,

νηματοειδείς διακλαδιζόμενοι η μη. Το χρώμα τους είναι συνήθως πράσινο λόγω της επικράτησης της χλωροφύλλης α. Αναπαράγονται με αγενή και εγγενή τρόπο. Είναι οργανισμοί παραγωγοί. Τα περισσότερα είναι μονοκύτταρα ενώ υπάρχουν και πολυκύτταρα που δεν ξεπερνούν ωστόσο το 1 m σε μέγεθος. Οι τρόποι ανάπτυξής τους παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1. Υπάρχουν διάφοροι μορφολογικοί τύποι, κινητοί με ένα έως πολλά μαστίγια, ή ακίνητοι, μικροσκοπικοί ή ορατοί με γυμνό μάτι, αποικιακοί, νηματοειδείς διακλαδιζόμενοι η μη. Είναι οργανισμοί παραγωγοί (Lewis & McCourt 2004, Ρουσσομουστακάκη και συν. 2007).



Εικόνα 5: Αντιπροσωπευτικά χλωροφύκη. 1. *Halosphaera* cf. *minor* (prasinophyte) 2. *Spirogyra maxima*(charophyte) 3. *Klebsormidium flaccidum* (charophyte) 4. *Chlorokybus* sp. (charophyte) 5. *Caulerpa* (Θαλάσσιο μακροφύκος, anulvophyte) 6. *Mesostigma* (charophyte) 7. Τμήμα από θαλλό του *Coleochaeteorbicularis* με αυγά (charophyte) 8. *Entransia fimbriata* (charophyte) 9. *Ulothrix* sp. (ulvophyte) 10. *Myrmecia* sp. (trebouxiophyte) 11. Αποικιακό φυτοπλαγκτό *Pediastrum duplex* (chlorophyte) 12. *Microthamnion* sp. (trebouxiophyte) 13-14. Μακροσκοπική και μικροσκοπική όψη του δικτύου *Hydrodictyon reticulatum* (chlorophyte) 15. *Nitella hyaline* με πορτοκαλί φυλετικά όργανα (charophyte) 16. *Trentepohlia* sp. με άφθονες πορτοκαλί δευτερογενείς χρωστικές, προσκολλημένο σε βράχο (ulvophyte) 17. *Chlorosarcinopsis* sp. (chlorophyte) (Lewis & McCourt 2004).

Φαιοφύκη (Phaeophyta, Brown algae).

Τα Φαιοφύκη είναι σχεδόν αποκλειστικά θαλάσσια βενθικά φύκη. Μόνο τρία γένη (από τα περίπου 250 που έχουν περιγραφή) είναι γνωστά από γλυκά νερά. Το χαρακτηριστικό καστανό χρώμα τους οφείλεται στη χρωστική φουκοξανθίνη που επισκιάζει την χλωροφύλλη α. Είναι πολυκύτταρα με μεγάλη ποικιλία στη μορφή και τη δομή τους. Υπάρχουν μικροσκοπικές νηματοειδείς μορφές που είναι και οι πιο απλές, όπως και απλές μορφές δίσκου, μέχρι φυλλόμορφες πολύπλοκες και μεγάλων διαστάσεων που είναι γνωστές σαν Kelps, και μπορεί να σχηματίζουν υποθαλάσσια δάση. Ορισμένα έχουν κύστες από αέρα που τα βοηθούν να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού και να εκμεταλλεύονται αποτελεσματικότερα το ηλιακό φως. Τα περισσότερα απαντώνται σε παράκτιες περιοχές στερεωμένα πάνω σε διάφορα υποστρώματα, με δυνατό, χαρακτηριστικό δίσκο προσκόλλησης. Είναι τα πιο συνηθισμένα φύκη των βραχωδών ακτών. Αν και μοιάζουν πολύ με ανώτερα φυτά, είναι πρωτόγονα. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τόσο μικροφύκη, όσο και μακροφύκη.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα στελέχη, το μέσο μέγεθος καθώς και το ξηρό βάρος των κυττάρων οκτώ τάξεων μικροφυκών. Να επισημανθεί ότι τα στελέχη αντιστοιχούν στην κατάταξη που έχει αποδοθεί από το νορβηγικό ινστιτούτο αναλύσεων νερού (NIVA), το οποίο αποτελεί μια από τις σημαντικότερες, αν όχι την σημαντικότερη, καλλιεργητικές συλλογές προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών φωτοσυνθετικών μικροφυκών με πάνω από 900 στελέχη. Τέλος, στον Πίνακα 3 φαίνονται τα κύρια καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών, τα προϊόντα και το πεδίο εφαρμογής τους, καθώς και η οικονομική τους αξία.

Πίνακας 2: Σύνοψη 8 τάξεων μικροφυκών με διάκριση των στελεχών, του μέσου μεγέθους και του ξηρού βάρους των κυττάρων. (Patil *et al.* 2007)

Τάξη	Γένος/ Είδος	Γλυκού /Θαλασσινού νερού	Στελέχοι	Μέσο μέγεθος κυττάρου $\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$	Ξηρό βάρος κυττάρου $10^{-9} \text{ mg cell}^{-1}$
Κυανοφύκη	<i>Chroococcus sp.</i>	Θαλασσινού	NIVA-CYA 330	12	8,6
	<i>Synechococcus sp.</i>	Θαλασσινού	NIVA-CYA 379	1,8	1,2
Πρυμνησιοφύκη	<i>Isochrysis galbana</i>	Θαλασσινού	NIVA-4/91	45	16
	<i>Pavlova sp.</i>	Θαλασσινού	NIVA-4/92	49	13
Διάτομα	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Θαλασσινού	NIVA-BAC 2	44	19
Ροδόφυτα	<i>Porphyridium cruentum</i>	Θαλασσινού	NIVA-1/92	227	150
Κρυπτόφυτα	<i>Rhodomonas baltica</i>	Θαλασσινού	NIVA-5/91	262	120
	<i>Oocystis sp.</i>	Γλυκού	NIVA-CHL 154	21	19
Χλωροφύκη	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Γλυκού	NIVA-CHL 1	62	30
	<i>Tetraselmis suecica</i>	Θαλασσινού	NIVA-3/92	450	220
Ξανθοφύκη	<i>Tribonema sp.</i>	Γλυκού	NIVA-1/84	200	140
Ευστιγματοφύκη	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Θαλασσινού	NIVA-2/03	15	6,4

Πίνακας 3: Κύρια καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών, πεδίο εφαρμογής και οικονομική τους αξία (Γκέλης 2015)

Μικροφύκος	Τάξη	Ετήσια παραγωγή (τόνοι)	Παραγωγός χώρα	Πεδίο εφαρμογής	Τιμή €
<i>Spirulina (Arthrospira)</i>	Κυανοφύκη	4500,00	Κίνα, Ινδία, ΗΠΑ, Μιανμάρ, Ιαπωνία, Ελλάδα	ανθρώπινη διατροφή, ζωοτροφές, καλλυντικά	36 kg ⁻¹
<i>Chlorella spp.</i>	Χλωροφύκη	2500,00	Ταϊβάν, Γερμανία, Ιαπωνία	ανθρώπινη διατροφή, καλλυντικά, υδατοκαλλιέργειες	36 kg ⁻¹
<i>Dunaliella salina</i>	Χλωροφύκη	2000,00	Αυστραλία, Ισραήλ, ΗΠΑ, Ιαπωνία	ανθρώπινη διατροφή, καλλυντικά, β-καροτένιο	50 L ⁻¹
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	Κυανοφύκη	500,00	ΗΠΑ	ανθρώπινη διατροφή	215-2150 kg ⁻¹
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Χλωροφύκη	300,00	ΗΠΑ, Ινδία, Ισραήλ	ασταξανθίνη, υδατοκαλλιέργειες	7150 kg ⁻¹ / 50 L ⁻¹
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Δινοφύκη	240,00	ΗΠΑ	DHA	43 g ⁻¹
<i>Schizochytrium sp.</i>	Σταχυομαστιγωτά	240,00	ΗΠΑ	DHA	43 g ⁻¹

3.3 Παράμετροι ανάπτυξης μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των μικροφυκών αποτελούν πολύπλοκα συστήματα όπου αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Παρακάτω δίνονται αναλυτικά οι εν λόγω παράγοντες:

1. Φωτισμός: Η ένταση, η διάρκεια καθώς και η ποιότητα του φωτισμού είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών. Το φάσμα του φωτός πρέπει να είναι επιλεγμένο με τέτοιο τρόπο που να αξιοποιείται από τα μικροφύκη για την ανάπτυξη τους και κυμαίνεται μεταξύ 400-700 nm (ενεργή φωτοσυνθετική ακτινοβολία) (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Τα είδη των μικροφυκών περιέχουν σε διαφορετικές αναλογίες τις διάφορες φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και ως εκ τούτου αξιοποιούν λιγότερο ή περισσότερο διαφορετικά μήκη κύματος. (Markou *et al.*, 2012). Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης η ηλιακή ενέργεια μετατρέπεται σε χημική ενέργεια με αποτέλεσμα να παράγονται υδατάνθρακες με τη συμβολή του διοξειδίου του άνθρακα και του νερού. Ο φωτισμός θεωρείται από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Η αύξηση πέρα από το όριο της τιμής της έντασης του φωτός, συμβάλλει στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της βιομάζας. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φωτοαναστολή. Όταν οι εντάσεις φωτός είναι μεγαλύτερες από τα επίπεδα στα οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος τότε η ανάπτυξη των μικροφυκών φωτοαναστέλεται (Chisti, 2007). Η φωτοπερίοδος είναι μία ακόμα παράμετρος η οποία επηρεάζει την ανάπτυξη καθώς επίσης και την απόδοση των φωτοβιοαντιδραστήρων διότι διαφέρουν οι απαιτήσεις σε φωτισμό των διαφορετικών ειδών (Mata *et al.*, 2012).

2. Θερμοκρασία: Η θερμοκρασία θεωρείται ο καθοριστικότερος παράγοντας μετά τον φωτισμό για την ανάπτυξη των μικροφυκών. Πολλά μικροφύκη έχουν τη δυνατότητα να αντέχουν σε μεγάλα θερμοκρασιακά εύρη, για παράδειγμα το είδος *Nannochloropsis oculata* αντέχει σε ελάχιστες θερμοκρασίες έως 2°C και μέγιστες έως 29°C , ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 20-25°C (Muller-Feuga *et al.*, 2003) . Η θερμοκρασία έχει συνδυαστική δράση με τον φωτισμό. Η πλειονότητα των μικροφυκών αναπτύσσεται μεταξύ 20-30°C, όμως υπάρχουν και θερμοφιλα στελέχη τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες ως 40-42°C (Markou *et al.*, 2010).

3. Θολερότητα: Η θολερότητα διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην καλλιέργεια μικροφυκών διότι επηρεάζει τη διάχυση του φωτός μέσα σε αυτή. Η ομογενοποίηση και η ανάμειξη της καλλιέργειας βοηθούν στη σωστή κατανομή των θρεπτικών, τη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα καθώς και την κυκλοφορία των κυττάρων των μικροφυκών από το σκοτάδι στη ζώνη του φωτός. Η χαμηλή τιμή της θολερότητας έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη ανάμειξη καθώς και τη διαπερατότητα του φωτός σε ολόκληρη την καλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά, η υψηλή θολερότητα μπορεί να προκαλέσει παρεμπόδιση στο φως αλλά και τη καταστροφή των κυττάρων λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε βιομάζα (Βεργίνη, 2014).

4. Αλατότητα: Κάθε είδος μικροφύκους έχει διαφορετικό επιθυμητό εύρος αλατότητας. Για τα είδη που έχουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, η οποία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 24 g/L, παρόλα αυτά η αυξημένη αλατότητα επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των μικροφυκών επιδρώντας άμεσα στο σύστημα της φωτοσύνθεσης (Markou *et al.*, 2010).

5. pH: Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με pH που κυμαίνεται μεταξύ 6 - 9. Παρόλα αυτά υπάρχουν είδη που είναι οξύφιλα (όπως το *Chlamydomonas acidophila*) αλλά και αλκαλόφιλα (όπως το *Arthrospira*) (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Απότομη αλλαγή στο pH μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην καλλιέργεια (Markou *et al.*, 2010).

6. CO₂: Το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα, ο οποίος μαζί με το άζωτο, το φώσφορο και το κάλιο χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των φυκών. Η επίδραση του στην ανάπτυξη των μικροφυκών έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής βιομάζας και της συσσώρευσης λιπιδίων με την αύξηση της περιεκτικότητας του CO₂ (Βεργίνη, 2014).

7. Θρεπτικά συστατικά: Τα μικροφύκη προκειμένου να πολλαπλασιαστούν εκτός από την ενέργεια αλλά και τον άνθρακα χρειάζονται και άλλα ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι αναγκαία για τις διάφορες μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες. Τα κυριότερα θρεπτικά στοιχεία που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των μικροφυκών, είναι το άζωτο, ο φώσφορος και το κάλιο (Βεργίνη, 2014). Αναγκαία αλλά σε μικρότερες ποσότητες είναι στοιχεία όπως το θείο, το πυρίτιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το μολυβδαίνιο, το μαγγάνιο, το νικέλιο, το βόριο, το χλώριο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, και το κοβάλτιο (Christenson and Sims, 2011). Σε περιπτώσεις θρεπτικής στέρησης είναι γνωστό ότι τα μικροφύκη επιβραδύνουν την ανάπτυξή τους και τείνουν να χρησιμοποιούν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά για την παραγωγή λιπιδίων ή υδατανθράκων αντί πρωτεϊνών. Συνήθως, μείωση της συγκέντρωσης αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας

οδηγεί στην σύνθεση μεγαλύτερων ποσοτήτων λιπιδίων και υδατανθράκων (Mata *et al.*, 2012).

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι παρότι η πλειοψηφία των μικροφυκών είναι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, ορισμένα μικροφύκη έχουν την ικανότητα να ακολουθούν διάφορους τύπους μεταβολισμού και να εναλλάσσουν τον μεταβολισμό τους ανάλογα της μορφής της διαθέσιμης ενέργειας και του διαθέσιμου άνθρακα (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Οι μεταβολικοί τύποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν ορισμένα μικροφύκη είναι:

1) Φωτοαυτότροφος: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και ως πηγή άνθρακα το CO₂ ή άλλες ανόργανες μορφές (Muller-Feuga *et al.*, 2003) ,

2) Ετερότροφος: Στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και πηγή άνθρακα διάφορες οργανικές ουσίες όπως γλυκόζη, οξικό οξύ, γλυκερίνη κλπ. (Muller-Feuga *et al.*, 2003),

3) Μιξότροφος: τα μικροφύκη στον τύπο αυτό είναι σε θέση να αυξάνονται/πολλαπλασιάζονται είτε αξιοποιώντας τον ήλιο ως πηγή ενέργειας είτε αξιοποιώντας διάφορες οργανικές ουσίες και ως πηγή άνθρακα είτε το CO₂ είτε τις οργανικές ουσίες (Muller-Feuga *et al.*, 2003) και

4) Φωτοετερότροφος: στον τύπο αυτό τα μικροφύκη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και σαν πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

Ο ετερότροφος και μιξότροφος μεταβολισμός μπορούν να αποτελέσουν ιδανική καλλιεργητική τεχνική για την παραγωγή μικροφυκών, γιατί έτσι αντιμετωπίζεται το πρόβλημα της αξιοποίησης του φωτός σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα ή σε καλλιέργειες με φωτοπαρεμπόδιση (κατά τους καλοκαιρινούς μήνες).

Στις ετερότροφες ή/και μιξότροφες καλλιέργειες η προσθήκη οργανικού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας δίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες καλλιέργειες. Γενικά όμως ο μιξότροφος μεταβολισμός έχει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγαλύτερη τελική παραγωγή σε βιομάζα σε σχέση με τους άλλους τρεις μεταβολισμούς (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2004).

3.4 Τεχνολογία παραγωγής μικροφυκών

Η καλλιέργεια των μικροφυκών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιεργειών. Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκοι, λίμνες κ.λπ. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες, η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες (photobioreactors). Οι φωτοβιοαντιδραστήρες αποτρέπουν την άμεση επαφή της καλλιέργειας με τις εξωτερικές συνθήκες και έτσι την προστατεύουν από τους διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Pulz 2001, Richmond 1992).

Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες έχουν το πλεονέκτημα ότι έχουν σχετικά μικρότερο κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας από τις κλειστού τύπου καλλιέργειες και έχουν σχετικά καλή δυνατότητα μαζικής καλλιέργειας μικροφυκών (Jorquera *et al.* 2010). Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες όμως τα μικροφύκη είναι εκτεθειμένα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνήθως επιμολύνονται από διάφορα άλλα είδη μικροφυκών ή βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών. Οι επιμολύνσεις με άλλους μικροοργανισμούς αλλοιώνει την σύσταση των καλλιεργειών και δυσχεραίνει την εφαρμογή της μονοκαλλιέργειας. Έντονες επιμολύνσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μικρή παραγωγή ή και σε ορισμένες περιπτώσεις την

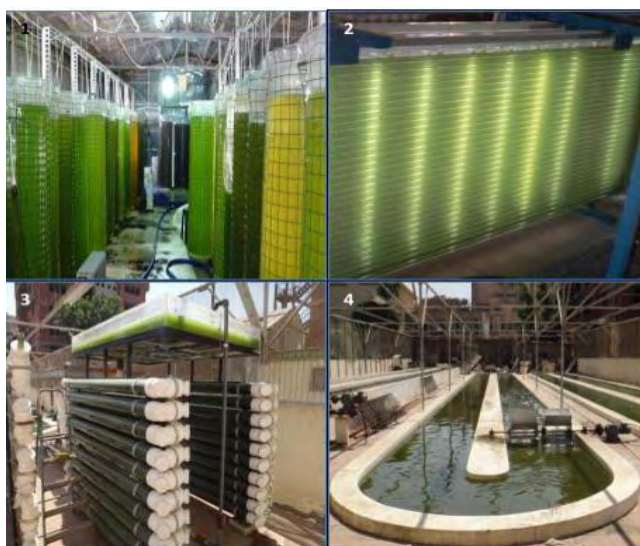
κατάρρευση της καλλιέργειας είτε λόγω της επικράτησης άλλων μικροοργανισμών είτε λόγω της εμφάνισης παρασιτικών ασθενειών (Day *et al.* 2011). Οι ανοικτού τύπου καλλιέργειες μειονεκτούν επιπλέον λόγω της εξάτμισης νερού που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών ποσοτήτων νερού και την αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων που από ένα επίπεδο και πάνω επιδρούν ανασταλτικά στην αύξηση των μικροφυκών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη αναπλήρωσης νερού άρα και χρήσης μεγάλων ποσοτήτων του. Παρόλα αυτά το νερό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί θα μπορεί να είναι υφάλμυρο ή αλμυρό, ανάλογα με το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται και την ανεκτικότητά του στην παρουσία αλάτων (Bilanovic *et al.* 2009) αντλώντας και χρησιμοποιώντας έτσι μη πόσιμο ή/και μη αρδεύσιμο νερό από διάφορες πηγές. Τέλος, η παραγωγή ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρότερη σε σχέση με τις κλειστού τύπου καλλιέργειες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της βιομάζας να είναι σχετικά μικρή ανεβάζοντας πολύ το κόστος συγκομιδής (Norsker *et al.* 2011).

Στις καλλιέργειες κλειστού τύπου, οι συνθήκες είναι περισσότερο ή λιγότερο ελεγχόμενες, αναλόγως αν πρόκειται για καλλιέργειες στεγασμένες ή υπαίθριες. Στις υπαίθριες καλλιέργειες οι συνθήκες δεν ελέγχονται πλήρως (ηλιακή ένταση και θερμοκρασία). Αντίθετα στις στεγασμένες καλλιέργειες, οι συνθήκες με τον ένα ή άλλο τρόπο είναι πιο ελεγχόμενες. Οι κλειστού τύπου καλλιέργειες πραγματοποιούνται στους φωτοβιοαντιδραστήρες. Τα υλικά κατασκευής και τα σχήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων ποικίλουν. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι (Chisti 2007, Chen1996):

1. καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας,
2. μεγαλύτερος λόγος επιφάνειας/όγκου,
3. περιορισμός της εξάτμισης νερού από το υπόστρωμα καλλιέργειας,

4. καλύτερη θερμική κατανομή στο υπόστρωμα καλλιέργειας,
5. σχετικά εύκολη εγκατάσταση σε ανοιχτό χώρο,
6. προστασία από επιμολύνσεις από διάφορους μικροοργανισμούς
7. σχετικά υψηλές αποδόσεις σε σχέση με τις ανοικτές δεξαμενές

Ένας τυπικός βιοαντιδραστήρας αποτελείται από τρία μέρη, την υγρή φάση την οποία συνιστά το θρεπτικό μέσο, τη στερεά φάση, την οποία συνιστούν τα κύτταρα της καλλιέργειας και την αέρια φάση. Συχνά, το φως, αναφέρεται ως τέταρτη φάση των βιοαντιδραστήρων. Οι διαφορετικές απαιτήσεις των κυττάρων, ως προς τις συνθήκες καλλιέργειας και η αξία των προϊόντων που παράγονται, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων τύπων βιοαντιδραστήρων όπως οι σωληνοειδείς, και οι επίπεδοι βιοαντιδραστήρες, οι αεροαναδευόμενοι (airlift and bubble column) και οι πλήρους αναμείξεως (stirred tank), (Posten 2009). Στην Εικόνα 6 βλέπουμε διάφορους τύπους συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών.



Εικόνα 6: Διάφοροι τύποι συστημάτων καλλιέργειας μικροφυκών. (1) Πλαστικοί σάκοι 300 λίτρων, (2) επίπεδοι φωτοαντιδραστήρες, (3) οριζόντιοι σωληνωτοί φωτοαντιδραστήρες και (4) ανοικτή δεξαμενή τύπου raceway (Μάρκου και συν. 2015).

3.5 Θρεπτική αξία μικροφυκών

Η θρεπτική σύσταση των μικροφυκών επηρεάζεται άμεσα από τη φάση ανάπτυξης τους (εκθετική ή ακίνητη) και από τις συνθήκες καλλιέργειας όπως η συχνότητα φωτός (Brown *et al.* 1993), την ένταση του φωτός (Thompson *et al.* 1993), τη θερμοκρασία (Thompson *et al.* 1992) και το μέσο καλλιέργειας (Wikfors *et al.* 1996). Η βιβλιογραφία, ωστόσο, βασίζεται σε αποτελέσματα που έχουν παρθεί με βιομάζες που παρήχθησαν σε μειωμένους όγκους και υπό διαφορετικές, και συνάμα πολύ μεταβλητές, συνθήκες (Muller-Fuega *et al.* 2016). Ως εκ τούτου, η γνώση μας σχετικά με τη θρεπτική σύσταση των διαφόρων ειδών μικροφυκών παραμένει ασαφής. Γενικά, ορισμένα είδη μικροφυκών έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη (Πίνακας 4). Ακόμη τα μικροφύκη είναι πλούσιες πηγές βιταμινών που μπορούν να ικανοποιήσουν τις διατροφικές απαιτήσεις των υδρόβιων οργανισμών (Seguineau *et al.* 1996; Brown *et al.* 1999).

Πίνακας 4: Σύσταση (% ξηράς ουσίας) ειδών μικροφυκών σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια (Li, Yan, *et al.* 2009)

Είδος	Πρωτεΐνη (%)	Υδατάνθρακες (%)	Λιπίδια (%)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Prophyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedes mus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Το 1997 ο Brown και οι συνεργάτες του εκτόνησαν ένα πρωτοποριακό για την εποχή πείραμα στο οποίο μελετήθηκε η βιοχημική σύσταση 40 ειδών μικροφυκών, που καλλιεργήθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες. Το κύριο οργανικό συστατικό αποτελούσαν οι πρωτεΐνες (15-52% του ξηρού βάρους), ακολουθούσαν τα λίπη (5-20%) και οι υδατάνθρακες (5-12%) (Muller-Feuga *et al.* 2003). Να τονιστεί, ότι το λιπιδικό περιεχόμενο ήταν υψηλότερο στα διάτομα με ποσοστό που ξεπερνούσε το 18%. Στον πίνακα που ακολουθεί μπορούμε να δούμε την περιεκτικότητα σε λίπος ορισμένων ευρέως χρησιμοποιούμενων μικροφυκών (Li, Yan, *et al.* 2009).

Πίνακας 5: Περιεκτικότητα σε λίπος (% ξηρό βάρος) ειδών μικροφυκών (Li, Yan, *et al.* 2009)

Μικροφύκος	Περιεκτικότητα σε λίπος (% ξηρο βάρος)
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Όπως προαναφέρθηκε η σύσταση των μικροφυκών σε θρεπτικά συστατικά εκτός των άλλων επηρεάζεται άμεσα και από την φάση ανάπτυξης της βιομάζας. Στον Πίνακα 6 φαίνεται ενδεικτικά η διαφοροποίηση της σύστασης διαφόρων ειδών

μικροφυκών ως προς τις πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια αναλόγως της φάσης ανάπτυξης τους.

Πίνακας 6: Διαφοροποίηση της σύστασης διαφόρων ειδών μικροφυκών ως προς τις πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια αναλόγως της φάσης ανάπτυξης τους.

Είδος μικροάλγρων	Παρατηρήσεις	Πρωτεΐνες	Υδατάνθρακες	Λιπίδια	Πηγή
<i>Anabaena cylindrica</i>		43-56	25-30	4-7	E.W. Becker 2007
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 6 της φάσης ανάπτυξης	28,1		14,4	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 8 της φάσης ανάπτυξης	36,1		16,8	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 10 της φάσης ανάπτυξης	29,3		13,3	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 13 της φάσης ανάπτυξης	17,9		11,1	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 16 της φάσης ανάπτυξης	17,9		9,33	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Anacystis nidulans</i>	Ημέρα 22 της φάσης ανάπτυξης	19,1		10,2	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Isochrysis galbana</i>		29	12,9	23	Brown M. 1991
<i>Isochrysis galbana</i>	Εκθετική φάση, 20 ° C	39,97	15,21	28,6	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Isochrysis galbana</i>	Αρχή στατικής φάσης	24,95	37,92	25,88	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Isochrysis galbana</i>	Τέλος στατικής φάσης	13,29	48,35	36,16	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Isochrysis galbana</i>		37	11	24	Witt et al., 1981
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 5 της φάσης ανάπτυξης	33,6		25,7	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 8 της φάσης ανάπτυξης	33,7		26,2	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 11 της φάσης ανάπτυξης	18,7		24,1	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 14 της φάσης ανάπτυξης	10,2		36,9	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 18 της φάσης ανάπτυξης	8,5		42,2	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ημέρα 22 της φάσης ανάπτυξης	7,44		47,1	M. Piorreck, P. Pohl 1984
<i>Scenedesmus obliquus</i>		50-56	10-17	12-14	E.W. Becker 2007
<i>Tetraselmis suecica</i>		31	12	10	Brown M. 1991
<i>Tetraselmis suecica</i>	Εκθετική φάση, 20 ° C	40,85	12,3	24,4	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Tetraselmis suecica</i>	Αρχή στατικής φάσης	14,59	37,39	16,96	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Tetraselmis suecica</i>	Τέλος στατικής φάσης	16,42	43,23	14,83	Fernandez-Reireiz M.J.et al 1989
<i>Tetraselmis suecica</i>	Εκθετική φάση	44,17		9,08	Whyte, 1987
<i>Tetraselmis suecica</i>	Στατική φάση	42,27		10,35	Whyte, 1987
<i>Tetraselmis suecica</i>		41,39			J. Fabregas και C. Herrero 1985

Σημείωση 1: Οι διαφορές στις συνθήκες καλλιέργειας, στις μεθόδους ανάλυσης ή τη φάση ανάπτυξης του δείγματος, δυσκολεύουν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται από διαφορετικούς συγγραφείς στη βιβλιογραφία.

3.6 Σύσταση μικροφυκών σε λιπαρά οξέα

Γενικά, η βιβλιογραφία σχετικά με τη σύσταση των μικροφυκών σε λιπαρά οξέα, είναι αρκετά περιορισμένη. Τα διάφορα είδη μικροφυκών δύναται να συσσωρεύουν διάφορα επίπεδα λιπών εντός του κυττάρου τους. Η περιεκτικότητα των μικροφυκών σε λιπίδια κυμαίνεται από 1 έως 70% της κυτταρικής τους μάζας και σε ορισμένα είδη μπορεί να φτάσει το 90% της ξηρής βιομάζας τους (Mata *et al.* 2010). Όπως στα φυτά, αλλά και στους ζωικούς οργανισμούς, έτσι και στα μικροφύκη τα λιπίδια συσσωρεύονται κυρίως υπό μορφή τριγλυκεριδίων (Ratledge 2004).

Η βιοσύνθεση των λιπιδίων όπως σε όλους τους μικροοργανισμούς έτσι και στα μικροφύκη επιτυγχάνεται όταν η καλλιέργεια τους γίνεται σε θρεπτικό μέσο το οποίο είναι περιοριστικό ως προς έναν παράγοντα. Ο παράγοντας ο οποίος αποτελεί συνήθως τον περιοριστικό παράγοντα για την αύξηση είναι το άζωτο. Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου το ποσοστό των λιπιδίων που συσσωρεύεται αυξάνεται σημαντικά (Hsieh & Wu 2009). Μετά την εξάντληση του περιοριστικού παράγοντα, η αφομοίωση του άνθρακα συνεχίζεται, όμως ο άνθρακας που αφομοιώνεται χρησιμοποιείται με σκοπό τη βιοσύνθεση λιπιδίων (Ratledge 2004).

Η βιοσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) είτε αερόβια είτε αναερόβια περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία είναι συνδεδεμένα στη μεμβράνη των κυττάρων (Certik & Shimizu 1999). Τα ένζυμα αυτά εισάγουν τους διπλούς δεσμούς και ονομάζονται αποκορεσμάσες (desaturases), (Harwood 1994). Οι αποκορεσμάσες αποτελούνται από τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες, τη NAD(P)H-αναγωγή του κυτοχρώματος b5, το κυτόχρωμα b5 και την τελική, ευαίσθητη στο κυάνιο, αποκορεσμάση.

Υπάρχουν τρεις τύποι αποκορεσμάσεων: η ακυλο-CoA αποκορεσμάση, η ακυλο-ACP αποκορεσμάση και η αποκορεσμάση των λιπαρών οξέων. Γενικά το

στεαρυλο-CoA ή το στεαρυλο-ACP είναι τα υποστρώματα στα οποία γίνεται η εισαγωγή του πρώτου διπλού δεσμού ώστε να σχηματιστεί το ολεοϋλο-CoA ή το ολεοϋλο-ACP, αντίστοιχα. Οι επακόλουθοι αποκορεσμοί πραγματοποιούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου τα λιπαρά οξέα είναι προσδεμένα στα φωσφολιπίδια (και ειδικότερα στη φωσφατιδυλοχολίνη). Ωστόσο, πέρα από την κύρια μεταβολική οδό με τους αποκορεσμούς στο ενδοπλασματικό δίκτυο πραγματοποιείται και άμεση μετατροπή των λιπαρών ακυλο-CoA στα αντίστοιχα PUFAs (Certik & Shimizu 1999).

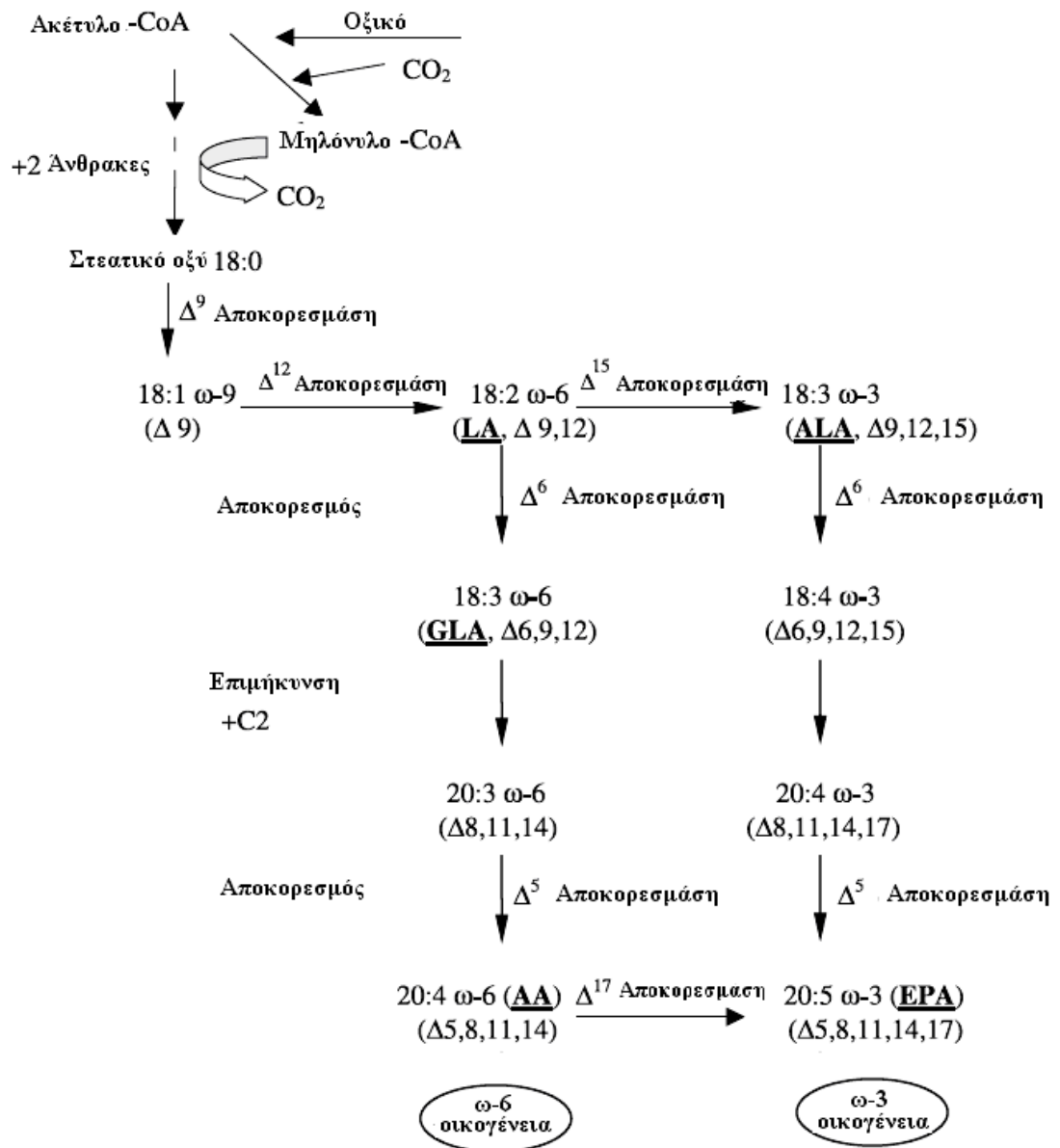
Κατά την αερόβια μεταβολική οδό, ο πρώτος διπλός δεσμός εισάγεται στη θέση 9 των κορεσμένων λιπαρών οξέων με τη δράση της Δ^9 αποκορεσμάσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτουν το παλμιτελαϊκό και ελαϊκό οξύ τα οποία είναι τα πιο κοινά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Το ελαϊκό οξύ στη συνέχεια με τη δράση της αποκορεσμάσης Δ^{12} μετατρέπεται σε λινελαϊκό οξύ το οποίο είναι δυνατό να μετατραπεί με τη δράση της Δ^{15} αποκορεσμάσης, σε α -λινολενικό οξύ. Το ελαϊκό, λινελαϊκό και το α -λινολενικό είναι τρία λιπαρά οξέα τα οποία αποτελούν τα βασικά λιπαρά οξέα από τα οποία προκύπτουν με διαδοχικές εισαγωγές διπλών δεσμών και επιμηκύνσεις, τα λιπαρά οξέα των οικογενειών ω -3, ω -6 και ω -9 (Wen & Chen 2003).

Τα λιπαρά οξέα της ω -9 οικογένειας προκύπτουν από αποκορεσμούς (Δ^6 , Δ^5) και επιμήκυνση της αλειφατικής αλυσίδας του ελαϊκού οξέος. Η ω -6 οικογένεια των λιπαρών οξέων προκύπτει συνήθως μετά από αποκορεσμούς (Δ^6 , Δ^5 , Δ^4) και επιμηκύνσεις της αλειφατικής αλυσίδας του λινελαϊκού οξέος. Τέλος, τα λιπαρά οξέα της ω -3 οικογένειας προκύπτουν από δύο μεταβολικές οδούς μια μεταβολική οδό εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία και μία ανεξάρτητη από αυτή. Στη μεταβολική οδό που δεν εξαρτάται από τη θερμοκρασία το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται μέσω του ω -3 μονοπατιού σε EPA, εικοσιδυοπεντανοϊκό (DPA- ω 3) και DHA. Στη δεύτερη μεταβολική οδό η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία, η βιοσύνθεση των λιπαρών

οξέων της ω-3 οικογένειας περιλαμβάνει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων της οικογένειας ω-6 στα αντίστοιχα της ω-3. Δύο ένζυμα που πιθανώς εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή είναι οι Δ15 και Δ17 αποκορεσμάσες (Wen & Chen 2003).

Ειδικότερα αναφέρεται η βιοσύνθεση του EPA, το οποίο είναι ένα ω-3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που αποτελείται από είκοσι άτομα άνθρακα με πέντε διπλούς δεσμούς. Οι διπλοί δεσμοί τοποθετούνται έτσι ώστε ο τελευταίος να απέχει τρία άτομα άνθρακα από το μεθυλικό ή ωμέγα άκρο της αλειφατικής αλυσίδας, και γι' αυτό αναφέρεται ως ω-3 λιπαρό οξύ (Milledge, 2011).

Υπάρχουν δύο μεταβολικές οδοί σύνθεσης του EPA, η ω-3 και ω-6. Και στις δύο μεταβολικές οδούς η πορεία ξεκινά από το παλμιτικό οξύ και είναι κοινή μέχρι το λινελαϊκό οξύ. Στην ω-6 μεταβολική οδό δρα η Δ⁶ αποκορεσμάση και από το λινελαϊκό προκύπτει το α-λινολενικό ενώ στην ω-3 μεταβολική οδό δρα η Δ¹⁵ αποκορεσμάση και προκύπτει το γ-λινολενικό. Από το σημείο αυτό και με τη δράση των κατάλληλων αποκορεσμασών και ενζύμων επιμήκυνσης, τελικά προκύπτει το EPA (Guschina & Harwood, 2006). Φαίνεται πως η μεταβολική οδός που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση του EPA στα μικροφύκη είναι η ω-6, δεδομένου ότι τα λιπαρά οξέα που συμμετέχουν σε αυτή είναι τα κύρια λιπαρά οξέα της βιοσύνθεσης του EPA. Ωστόσο, η ύπαρξη σε χαμηλά ποσοστά των ω-3 λιπαρών οξέων, C18:3-ω3 και C20:4ω-3, αποδεικνύει την ύπαρξη της ω-3 μεταβολικής οδού, η οποία όμως παρουσιάζει μικρότερη ενεργότητα (Khozin-Goldberg *et al.* 2002, Leonard *et.al.* 2004). Η ω-3 μεταβολική οδός είναι η κύρια οδός που χρησιμοποιούν οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί για τη βιοσύνθεση του EPA (Leonard *et.al.* 2004). Στην Εικόνα 7 φαίνεται η πορεία βιοσύνθεσης του EPA.



Εικόνα 7: Οι δύο μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης του EPA (Wen & Chen 2003, τροποποιημένο από Μπίρκου 2011)

Τα λιπίδια των μικροφυκών χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ασυνήθιστων λιπαρών οξέων. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη λιπαρών οξέων μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (>18C) και PUFAs. Η παρουσία, σε ποσοστό πάνω από 20 % λιπαρών οξέων όπως το EPA, το AA και το DHA, καθιστά τα μικροφύκη πολύ σημαντικά. και αυτό λόγω του ρόλου τους στην τροφική αλυσίδα (Harwood & Gushina 2009).

Ως γνωστόν, υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων που συσσωρεύονται στα διάφορα είδη μικροφυκών, δεδομένου ότι είναι «ειδική» για το κάθε είδος και επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας και από φυσικούς παράγοντες (Guschina & Harwood 2006). Η σύσταση των μικροφυκών σε λιπαρά οξέα ακολουθεί ένα μοτίβο ανάλογα με την ομάδα που εξετάζουμε (Napolitano *et al.* 1990). Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα μικροφύκη προσαρμόζονται στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες και αυτό αντικατοπτρίζεται στην ποικιλία που παρουσιάζει το πρότυπο των λιπιδίων τους και στην ικανότητά τους να συνθέτουν ασυνήθιστες ενώσεις (Guschina & Harwood 2006). Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι ποσότητες (σε mg g^{-1} ξηρού βάρους βιομάζας) 12 ειδών μικροφυκών σε λιπαρά οξέα (Pati *et al.* 2007).

Πίνακας 5: Προφίλ λιπαρών οξέων (ως mg g⁻¹ ξηρού βάρους βιομάζας) (Pati *et al.* 2007 τροποποιημένο)

	<i>Chroococcus sp.</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Pavlova sp.</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
Κορεσμένα λιπαρά οξέα						
C12:0	2,1	0,7	0	0	0	0
C14:0	0,1	5,6	8,9	7,5	8,8	5,9
C16:0	21,3	3,4	11,5	13,4	16,6	0,2
C18:0	0,3	0	0	0,4	0,6	0
C20:0	0,2	0	0	0	0	0
C24:0	0	0	0	0	1,6	0
SUM	24	9,7	20,4	21,3	27,6	6,1
Μονοακόρεστα						
C16:1	1,1	10,8	3,3	12,8	26	0
C18:1	0,4	0	13,1	2,9	1,8	0,1
C20:1	0	0	0		0	0
C22:1	0,1	0	0,6	0,8	0,3	0
SUM	1,6	10,8	17	16,5	28,1	0,1
Πολυακόρεστα						
C18:2	10,7	0	7	2,1	1,5	2,1
C18:3	1	0	3,8	1,8	0,3	0
C18:4	0,1	0	12,5	4,3	3,3	0
C20:2	0	0	0		0	0,3
C20:4	0,1	0	0	0,4	2,2	6
C20:5	0	0	0	18	28,4	6,1
C22:5	0	0	0,8		1,3	0
C22:6	0	0	15,8	13,2	0,2	0
SUM	11,9	0	39,9	39,8	37,2	14,5

Πίνακας 5 (συνέχεια):

	<i>Rhodomonas baltica</i>	<i>Oocystis sp.</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Tetraselmis sp.</i>	<i>Tribonema sp.</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>
Κορεσμένα λιπαρά οξέα						
C12:0	2	0	0	0	0	1,2
C14:0	4,1	0,2	0,1	0,5	1,1	16,9
C16:0	6	3,8	16,2	6,3	2,5	17,2
C18:0	0,8	0	1,3	1,2	0,1	1,8
C20:0	0,1	0	0,2	0	0	0
C24:0	4	0,1	0,7	0	0	0
SUM	17	4,1	18,5	8	3,7	37,1
Μονοακόρεστα						
C16:1	0,4	1,5	1	1,3	5,1	18,2
C18:1	3,4	3,9	31,1	10,7	0,2	4,1
C20:1	0,1	0	0,9	0,9	0	0,5
C22:1	0,1	0	0,8	0	0	
SUM	4	5,4	33,8	12,9	5,3	22,8
Πολυακόρεστα						
C18:2	11,7	6,4	5,1	2,5	0,2	9,7
C18:3	12	8,1	11,4	6,4	0	0,5
C18:4	5,1	0,7	3	4,1	0,1	
C20:2	0,1	0	0	0	0	0,5
C20:4	0,2	0,5	0	0,6	0	3,7
C20:5	4,4	1,1	0	4,8	3,2	23,4
C22:5	0,2	0	2,1	0	0	0
C22:6		0	0,1	0,2	0	0
SUM	33,7	16,8	21,7	18,6	3,5	37,8

Η συνολική περιεκτικότητα σε λίπη και η κατανομή τους, ποικίλει σημαντικά ανάλογα με την κατάσταση της καλλιέργειας ή το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας (Muller-Feuga *et al.*, 2003). Η μείωση της θερμοκρασίας, γενικά, αυξάνει τα επίπεδα των PUFA, όμως αυτή η παραδοχή έχει αντίκρουσμα σε ορισμένα είδη θαλάσσιου φυτοπλαγκτού (Thompson *et al.* 1992). Και ο φωτισμός μπορεί να έχει επίδραση στην διακύμανση του λιπιδικού περιεχομένου αλλά όχι τόσο αξιοσημείωτη (Muller-Feuga *et al.* 2003). Στα γένη *Isochrysis* καθώς και στα είδη *Pavlova lutheri* και *Thalassiosira pseudonana* η ακτινοβολία προκάλεσε μικρή αλλαγή τόσο στο ποσοστό των λιπιδικών τάξεων, όσο και στην σύνθεση των λιπαρών οξέων (Thompson *et al.* 1996; Brown *et al.* 1993a). Αντίθετα, στα γένη *Nannochloropsis* παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των EPA αυξάνεται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις γαλακτολιπιδίων (Sukenik *et al.* 1989). Λόγω κάποιων παραμέτρων (Πίνακας 6), όπως ο φωτισμός ή η φάση ανάπτυξης του μικροφύκου, είναι δύσκολο να προβλέψουμε την θρεπτική αξία όλων των μικροφυκών, ακόμη και αυτών που βρίσκονται στα ίδια γένη (De Pauw *et al.* 1984).

Πίνακας 6: Παράγοντες που επηρεάζουν το λιπιδικό περιεχόμενο και το βαθμό ακορεστότητας των λιπαρών οξέων στα μικροφύκη (De Pauw *et al.* 1984 τροποποιημένο)

Παράμετρος		Πηγή
Μεταβολή στο λιπιδικό περιεχόμενο		
Θερμοκρασία		Aaronson, 1973; Smith & Morris, 1980
Ένταση φωτισμού		Tipnis & Pratt, 1960
Θρεπτικός περιορισμός	Αζωτο Πυρίτιο	Fogg & Collyer, 1953; Shifrin 1980 Werner, 1977; Shifrin 1980
Προέλευση τροφής		Spoehr & Miller, 1949; Lee, 1980
Οσμωτική πίεση		Ben-Amotz & Avron, 1980; Dubinsky <i>et al.</i> 1980
Φάση ανάπτυξης		Collyer & Fog, 1955; Materassi <i>et al.</i> 1980
Μεταβολή στο βαθμό ακορεστότητας του λιπαρού οξέος		
Θερμοκρασία		Olson & Ingram, 1975; Materassi <i>et al.</i> 1980
Φωτισμός		Harris <i>et al.</i> 1967; Materassi <i>et al.</i> 1980; Shifrin <i>et al.</i> 1980
Μεταβολικός τύπος	Αυτότροφος Ετερότροφος	Harris <i>et al.</i> 1967; Materassi <i>et al.</i> 1980
Προέλευση τροφής		Lee, 1980
Φάση ανάπτυξης		Olson & Ingram, 1975

3.7 Ο ρόλος των μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες

Η θέση των μικροφυκών στην τροφική αλυσίδα και ο ρόλος τους στις υδατοκαλλιέργειες, είναι οι δύο βασικοί λόγοι για τους οποίους το ενδιαφέρον της βιοτεχνολογίας επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη νέων συστημάτων καλλιέργειας με σκοπό τη μαζική παραγωγή φυκών. Τα μικροφύκη παίζουν σημαντικό ρόλο στις υδατοκαλλιέργειες καθώς αποτελούν μέσο εμπλουτισμού του ζωοπλαγκτόν το οποίο χρησιμοποιείται σαν πρώτη τροφή των προνυμφών των ψαριών. Πέρα από τις πρωτεΐνες και την ενέργεια που μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας, από τα μικροφύκη μεταφέρονται στις προνύμφες και διάφορες βιταμίνες, χρωστικές, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλες (Brown 2002). Επιπλέον, τα μικροφύκη καταναλώνονται άμεσα από τα ψάρια, στα αρχικά προνυμφικά τους στάδια, και κατ'αυτό τον τρόπο τα θρεπτικά τους συστατικά μεταφέρονται απευθείας σε αυτά (Reitan *et al.* 1997).

Με την προσθήκη καλλιέργειας μικροφυκών στις δεξαμενές των ψαριών η παραγωγή των ψαριών αυξάνεται. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης που οδηγεί σε αυτή την αύξηση είναι άγνωστος, έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν αυτό το φαινόμενο (Brown 2002). Σύμφωνα με αυτές τις θεωρίες, αυτό μπορεί να οφείλεται στον περιορισμό του φωτός που φτάνει στις προνύμφες, στην διατήρηση της θρεπτικής ποιότητας του ζωοπλαγκτόν, λόγω της συνεχούς παρουσίας των μικροφυκών, στην έκκριση διαφόρων βιταμινών ή άλλων παραγόντων αύξησης από τα μικροφύκη και στην προβιοτική επίδραση των μικροφυκών στα ψάρια. Το πιθανότερο είναι, πως ο μηχανισμός αυτός είναι συνδυασμός όλων των παραπάνω (Brown 2002).

Τα μικροφύκη αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας στο υδρόβιο περιβάλλον αλλά και στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Είναι η τροφή των

ζωοπλαγκτονικών οργανισμών που εκτρέφονται, όπως των τροχοζώων, της *Artemia* spp., των κοπηπόδων κ.ά.. Εκτός της χρήσης του ως πηγή τροφής εισάγεται στις δεξαμενές των προνυμφικών και νυμφικών σταδίων των ψαριών, μυδίων, στρειδιών, γαρίδων κ.ά για την σταθεροποίηση της ποιότητας του νερού, τον έλεγχο του μικροβιακού φορτίου, καθώς και τη διατροφή των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών που δε καταναλώθηκαν από τις νύμφες (Shields & Lupatsch 2012). Μια άλλη ευρέως διαδεδομένη χρήση των μικροφυκών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς είναι μέσω της τεχνικής του πράσινου νερού. Κατά την τεχνική του πράσινου νερού, από την στιγμή της εκκόλαψης των αυγών και μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης, προστίθεται στο νερό των δεξαμενών μίγμα καλλιέργειας διαφόρων ειδών μικροφυκών. Η τεχνική του πράσινου νερού, είναι άμεσα συνυφασμένη με υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης καθώς και ρυθμό αύξησης των νυμφών (Conceição *et al.* 2010).

Ο ρόλος των μικροφυκών στις υδατοκαλλιέργειες ως συμπλήρωμα για την ενίσχυση της διατροφικής αξίας των ιχθυοτροφών είναι επίσης μια σημαντική πτυχή που πρέπει να μας απασχολήσει. Τα μικροφύκη μπορούν να αποτελέσουν είτε ως κύρια είτε ως συμπληρωματική, πηγή βιταμινών και ανόργανων αλάτων, χρωστικών, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών. Τα καροτενοειδή αποτελούν φυσικές χρωστικές τις οποίες οι ανώτεροι οργανισμοί, όπως τα ψάρια, τα μαλάκια και τα δίθυρα, δεν μπορούν να συνθέσουν αλλά τα προσλαμβάνουν μέσω της τροφικής αλυσίδας στην φύση, και μέσω της τροφής τους στις καλλιέργειες. Τα μικροφύκη είναι μια ευρέως διαδεδομένη πηγή καροτενοειδών στη βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτροφών. Από το είδος *Haematococcus pluvialis* παράγεται η ασταξανθίνη, μια χρωστική που χρησιμοποιείται στις τροφές των βιολογικά παραγόμενων σολομών (Shields & Lupatsch 2012). Επίσης, το ίδιο είδος έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει στην ενίσχυση του κόκκινου χρώματος του φαγκριού *Pagrus pagrus* (Chatzifotis *et al.* 2011), και της γαρίδας *Litopenaeus*

vannamei (Parisenti *et al.* 2011). Σε αντίθεση με τη χρήση των μικροφυκών ως χρωστικές των τροφών, όπου έχουν πλέον καθιερωθεί, όσων αφορά τη χρήση τους ως πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών και ανόργανων αλάτων καθώς και ως πηγή λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές δεν έχουν γίνει σημαντικά βήματα. Η βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας ερευνά την στροφή προς μια πιο βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον παραγωγή, και σίγουρα τα μικροφύκη θα παίξουν έναν ρόλο κλειδί προς την αειφορία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Προσδιορισμός λίπους και λιπαρών οξέων σε επιλεγμένα είδη μικροφυκών

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων (Πίνακας 8) που έγιναν στα είδη *Botryococcus braunii* και *Chlorella vulgaris* με διάφορες μεθόδους εκχύλισης, διαλύτη και χρόνου εκχύλισης, με σκοπό την επίδραση αυτών των παραμέτρων στην αποδοτικότητα της εκχύλισης των ολικών λιπών των ειδών. Τόσο το *Botryococcus braunii* όσο και η *Chlorella vulgaris* ανήκουν στην συνομοταξία των χλωροφυκών και είναι δύο είδη μικροφυκών που έχουν μεγάλη επιστημονική αναγνώριση.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες σε βιολογικά δείγματα: της υγρής μεθόδου (Folch *et al.* 1957) και της μεθόδου Soxhlet. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο πετρελαϊκός αιθέρας, που αποτελεί κοινό και φθηνό διαλύτη της μεθόδου Soxhlet και ο διαλύτης χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v), που αποτελεί έναν από τους ενδεδειγμένους διαλύτες για εκχύλιση μικροφυκών. Οι χρόνοι εκχύλισης που δοκιμάστηκαν ποίκιλλαν από 30 έως 240 λεπτά της ώρας.

Πίνακας 8: Σύγκριση συγκεντρώσεων ολικών λιπών (%) των ειδών *Botryococcus braunii* και *Chlorella vulgaris* με διάφορες μεθόδους εκχύλισης, διαλύτη και χρόνου εκχύλισης.

Είδος	Μέθοδος	Διαλύτης	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ολικά Λίπη (%)
<i>B. braunii</i>	Soxhlet	πετρελαϊκός αιθέρας	30	1,63 ± 0,13
<i>B. braunii</i>	Soxhlet	C:M 1:1	120	7,67 ± 0,33
<i>B. braunii</i>	Soxhlet	C:M 1:1	180	7,89 ± 0,09
<i>B. braunii</i>	Soxhlet	C:M 1:1	240	9,75 ± 0,33
<i>B. braunii</i>	Folch <i>et al.</i> (1957)	C:M 1:1	150	10,65 ± 0,58
<i>B. braunii</i>	Folch <i>et al.</i> (1957)	C:M 1:1	180	15,83 ± 6,47
<i>C. vulgaris</i>	Soxhlet	πετρελαϊκός αιθέρας	30	1,42 ± 0,02
<i>C. vulgaris</i>	Soxhlet	C:M 1:1	90	26,17 ± 7,43
<i>C. vulgaris</i>	Soxhlet	C:M 1:1	120	10,26 ± 0,65
<i>C. vulgaris</i>	Soxhlet	C:M 1:1	180	9,60 ± 1,62
<i>C. vulgaris</i>	Soxhlet	C:M 1:1	240	13,28 ± 0,58
<i>C. vulgaris</i>	Folch <i>et al.</i> (1957)	C:M 1:1	150	18,22 ± 2,98
<i>C. vulgaris</i>	Folch <i>et al.</i> (1957)	C:M 1:1	180	13,54 ± 3,08

Σημ.: C:M 1:1, χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από n=2.

Όπως έγινε φανερό, για το είδος *B. Braunii* η αποδοτικότερη εκχύλιση με την μέθοδο Soxhlet πραγματοποιήθηκε στον μέγιστο χρόνο εκχύλισης, δηλαδή τα 240 λεπτά και με διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v). Αντίθετα, στην υγρή μέθοδο (Folch et al. 1957) παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά λίπους από την μέθοδο Soxhlet και η αποδοτικότερη εκχύλιση έγινε επίσης στο μέγιστο χρόνο, δηλαδή τα 180 λεπτά, και με διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v). Για το είδος *C. Vulgaris* με την υγρή μέθοδο των Folch et al. (1957) παρατηρήθηκε αποδοτικότερη εκχύλιση στον μικρότερο χρόνο, δηλαδή στα 150 λεπτά. Όμως η μέθοδος της Soxhlet απέδωσε τα μεγαλύτερα ποσοστά ολικού λίπους και μάλιστα σε σχετικά μικρότερο χρόνο, 90 λεπτά. Και στις δύο μεθόδους αποδοτικότερος διαλύτης ήταν το χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v). Συγκριτικά στην αποδοτικότερη για το καθένα μέθοδο, το *C. Vulgaris* (με την μέθοδο Soxhlet) εμφάνισε ποσοστό ολικών λιπών $26,17 \pm 7,43$, ενώ το *B. Braunii* (με την υγρή μέθοδο) εμφάνισε ποσοστό ολικών λιπών $15,83 \pm 6,47$.

Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι με τους συγκεκριμένους χειρισμούς το *C. Vulgaris* έχει μεγαλύτερο ποσοστό ολικών λιπών έναντι του *B. Braunii* και πως ο αποδοτικότερος διαλύτης ανεξαρτήτως μεθόδου και μικροφύκους ήταν το χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v). Γίνεται έτσι αντιληπτό, ότι ανάλογα με το είδος του μικροφύκους έχουμε αποτελεσματικότερη εκχύλιση με διαφορετικό χειρισμό και μέθοδο.

Σύμφωνα με τους Laurens et al. (2012) επειδή τα λίπη των μικροφυκών είναι ένα πολύπλοκο μείγμα από πολικά και μη πολικά μόρια, η πολικότητα του διαλύτη επηρεάζει άμεσα την απόδοση των εκχυλισμένων λιπιδίων. Τα διαφορετικά ποσοστά ολικών λιπών ανάλογα με την μέθοδο, και τον χρόνο εκχύλισης σε καθένα από τα μικροφύκη δεν πρέπει να προκαλούν έκπληξη, δεδομένου ότι τα συστήματα διαλυτών

που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο ήταν πολύ διαφορετικά, ενισχύοντας το γεγονός ότι στη βαρυμετρική εκχύλιση οι μέθοδοι είναι εμπειρικοί και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις εκάστοτε παραμέτρους (Laurens *et al.* 2012). Για το είδος *C. Vulgaris*, οι Ryckebosch και Muylaert (2012) παρατήρησαν ότι με την υγρή μέθοδο των Folch *et al.* (1957) και με διαλύτη το χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v) παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά ολικών λιπών σε σχέση με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα, ως διαλύτη. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχύλισης ολικών λιπών (ποσοστό πάνω του 10%) σε μικροφύκη, επετεύχθη με την χρήση διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (v/v) και για χρόνο 180 λεπτών (Ramluckan *et al.* 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Συμπεράσματα

Τα μικροφύκη αποτελούν τη θεμέλια λίθο της τροφικής αλυσίδας στο υγρό περιβάλλον. Αποτελούν τις μηχανές παραγωγής διαφόρων θρεπτικών συστατικών με κυριότερα τα λιπαρά οξέα. Σε αντίθεση, τα ψάρια και τα καρκινοειδή πρέπει να λάβουν από την τροφή τους τα απαραίτητα λιπαρά οξέα αφού δε μπορούν να τα συνθέσουν. Αν αναλογιστεί κανείς τους ρυθμούς αύξησης της βιομηχανίας των υδατοκαλλιεργειών και την αυξανόμενη ζήτηση για τροφή προς τα εκτρεφόμενα είδη, παράλληλα με την τάση να αυξάνεται το ποσοστό λίπους στα σιτηρέσια, ειδικά των ψαριών, η χρήση των μικροφυκών ως πηγή λίπους και λιπαρών οξέων στις ιχθυοτροφές ενδέχεται να αποτελούσει μια ρεαλιστική και παράλληλα αειφόρα λύση. Ωστόσο, η περιορισμένη τεχνογνωσία και το αυξημένο κόστος για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μικροφυκών ικανών να αντικαταστήσουν τις υπάρχουσες πηγές λιπών και λιπαρών οξέων αποτελεί τροχοπέδη προς το παρόν.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ήδη έχουν παραχθεί τροφές για σολομούς, βάρους άνω του ενός κιλού, που περιέχουν μικροφύκη ως πηγή μέρους των λιπαρών οξέων και απομένει να διαφανεί η επιτυχία της χρήσης τους ως συμπλήρωμα λίπους στις ιχθυοτροφές για όλα τα είδη εκτρεφόμενων ψαριών. Η έρευνα στο κομμάτι της σωστής επιλογής του είδους του μικροφύκου και ο τρόπος με τον οποίον θα μπορούσε να γίνει η μαζική παραγωγή του, θα μπορούσε να φέρει την αειφόρα "επανάσταση" στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersen R. A. (1996) "Algae". In: J. C. Hunter-Cevera and C. A. Belt eds. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry, London, UK, p. 29-64

Andrade M. R. and Costa J. A. V. (2007) "Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate". *Aquaculture*, 264(1-4): 130-134

Becker EW (1994) Growth kinetics. In: Becker EW (Ed), *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 51-55.

Bell, J. G., D. R. Tocher, R. J. Henderson, J. R. Dick and V. O. Crampton (2003). "Altered Fatty Acid Compositions in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fed Diets Containing Linseed and Rapeseed Oils Can Be Partially Restored by a Subsequent Fish Oil Finishing Diet." *The Journal of Nutrition* 133(9): 2793-2801

Bell, J. G., R. J. Henderson, D. Tocher and J. Sargent (2004). "Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet." *Lipids* 39(3): 223-232.

Bell, J., J. McEvoy, D. Tocher, F. McGhee, P. Campbell and J. Sargent (2001). "Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism." *Journal of Nutrition* 131(5): 1535.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2001). Βιοχημεία. Ηράκλειο Κρήτης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Bhathena, S. J. (2000). "Relationship between fatty acids and the endocrine system." *BioFactors* 13(1-4): 35-39.

Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G. 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis. *Energ. Convers. Manage.*, 50, 262-267.

Brennan L. and Owende P. (2010) "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): 557-577

Brennan L. and Owende P. (2013) "Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards". In: J. W. Lee eds. *Advanced biofuels and bioproducts*, p. 553-599

Brennan, L., and Owende, P. 2013. Biofuels from microalgae: Towards meeting advanced fuel standards. in: *Advanced biofuels and bioproducts*, (Ed.) J.W. Lee, Springer New York, pp. 553-599

Brock T. D. (1967) "Life at high temperatures". *Science*, 158): 1012-1019

Brown R.M. 2002: Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. *CSIRO Marine Research* 3:281-292.

Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D., & Leroi, J. M. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous

cultures of *Isochrysis* sp.(clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5(3), 285-296.

Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 247-255.

Bunt J. S. and Wood E. J. C. (1963) "Microbiology and Antarctic sea ice". *Nature*, 199): 1254-1255

Certic M, Shimizu S. 1999: Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Journal of Science and Bioengineering* 1:1-14.

Chatzifotis, S., Vaz, J. U. A. N., Kyriazi, P., Divanach, P., & Pavlidis, M. (2011). Dietary carotenoids and skin melanin content influence the coloration of farmed red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e90-e100.

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

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294-306.

Chisti, Y., Moo-Young, M. 2002. Bioreactors. in: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, (Ed.) R.A. Meyers, Vol. 2, Academic Press. San Diego, pp. 247-271.

Chojnacka K., Marquez-Rocha F. J. (2004): Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology Advances* 3 (1), 21-34 pp.

Christenson, Logan, and Ronald Sims. "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts." *Biotechnology advances* 29.6 (2011): 686-702.

da Conceição, R. C., Frasso, C. V., da Silva, S. M. C., & de Medeiros, J. L. (2012). Caracterização Composicional e Transesterificação de óleo de microalga: uma abordagem computacional. *Quim. Nova*, 35(7), 1336-1342.

Day, J.G., Slocumbe, S.P., Stanley, M.S. 2011. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresour. Technol.*

De Pauw N. and Persoone G. (1988) "Micro-algae for aquaculture". In: M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka eds. *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge, p. 197-221

De Pauw, Niels, Jesus Morales, and Guido Persoone. "Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints." Eleventh International Seaweed Symposium. Springer Netherlands, 1984.

Falkowski P. G. (1980) "Primary Productivity in the Sea". New York, Plenum Press

FAO (2007). "Use of Wild Fish and/or Other Aquatic Species to Feed Cultured Fish and its Implications to Food Security and Poverty Alleviation." Food and Agriculture Organization of the United Nations and Marine Export Development Authority, Government of India.

FAO (2013). "Cultured Aquatic Species Information Programme - *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus,1758)."

FAO (2013). "FAO Reports-Prices." from <http://www.fao.org/economic/est/prices>

Faul, F.E., Erdfelder, A. G. Lang and A. Buchner (2007). "G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences." *Behavior research methods* 39(2): 175-191.

FAO (2012): Food and Agriculture Organisation of the United Nations "The state of the world fisheries and aquaculture."

Gkelis, S., P. Tussy F., & Zaoutsos N.. (2015). Isolation and preliminary characterization of cyanobacteria strains from freshwaters of Greece. *Open Life Sciences*. 10, 52-60.

Glencross, B. D., G. M. Turchini, G. Turchini, W. Ng and D. Tocher (2010). "Fish oil replacement in starter, grow-out, and finishing feeds for farmed aquatic animals." *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds:* 373-404.

Globefish (2013). "Market Report: Fish Oil - June 2013." From <http://www.globefish.org/fish-oil-june-2013.html>

Grewe C. B. and Pulz O. (2012) "The Biotechnology of Cyanobacteria". In: B. A. Whitton eds. *Ecology of Cyanobacteria II*, p. 707-739

Grewe, C.B., Pulz, O. 2012. *The Biotechnology of Cyanobacteria*. in: *Ecology of Cyanobacteria II*, (Ed.) B.A. Whitton, Springer Netherlands, pp. 707-739.

Guedes A. C. and Malcata F. X. (2012) "Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture". In: Z. Muchlisin eds. *Aquaculture*, p.

Guschina A.I., and **Harwood L.J.** (2006) : Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160–186.

Harun R., Jason W. S. Y., Cherrington T. and Danquah M. K. (2010) "Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, In Press, Uncorrected Proof):

Harun R., Singh M., Forde G. M. and Danquah M. K. (2010) "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3): 1037-1047

Harwood J. (1994): Lipid metabolism: Desaturases. In the lipid Handbook, Gunstone F, Harwood J, Padley F. Eds London, Chapman and Hall: 611-615.

Harwood L.J., and **Guschina A.I.** (2009): The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91:679-684.

Higgs, D. and **F. Dong** (2000). "Lipids and fatty acids." *Encyclopedia of Aquaculture*: 476-496.

Hsieh, Chih-Hung, and **Wen-Teng Wu.** "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation." *Bioresource technology* 100.17 (2009): 3921-3926.

Jassby A. (1988) "Spirulina: a model of microalgae as human food". In: C. Lembi and J. R. Waaland eds. *Algae and Human Affairs*, Cambridge, p. 149-179

Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.*, 101, 1406-1413.

Khozin-Goldberg, I., Bigogno, C., Shrestha, P., & Cohen, Z. (2002). Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *parietochloris incisa* (trebuxiophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 38(5), 991-994.

Laurens, L. M., Dempster, T. A., Jones, H. D., Wolfrum, E. J., Van Wychen, S., McAllister, J. S., ... & Gloe, L. M. (2012). Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. *Analytical chemistry*, 84(4), 1879-1887..

Lee RE (1999) *Phycology*. Cambridge University Press, p.32

Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS. (2004) "Elongation of long-chain fatty acids." *Progress in lipid research* 43.1: 36-54.

Levasseur, M., P. A. Thompson, and P. J. Harrison. "Limits to Microalgal Growth." *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Springer US, 1992. 519-519.

Lewis LA and McCourt RM (2004) Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* 91:1535–1556.2004.

Li, Y., Moore, R. B., Qin, J. G., Scott, A., & Ball, A. S. (2013). Extractable liquid, its energy and hydrocarbon content in the green alga *Botryococcus braunii*. *biomass and bioenergy*, 52, 103-112.

Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. 2012. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(8), 2661-2670.

Mata M.T, Martins A.A, Caetano S.N. (2010) : Microalgae for biodiesel and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 217-232.

McMurry, J. (2005). Βιομόρια: Λιπίδια. Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2: 1345-1379.

Milledge J.J. (2011): Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 10:31-41.

Mondal, K., A. Kaviraj and P. Mukhopadhyay (2006). "Fish wastes in urban and suburban markets of Kolkata: Problems and potentials." *Aquaculture Asia* 11: 22-25.

MPOB (2005). *Malaysian Oil Palm Statistics 2005*, Malaysian Palm Oil Board, Selangor

Myhr, A. I. and **R. A. Dalmo** (2005). "Introduction of genetic engineering in aquaculture: Ecological and ethical implications for science and governance." *Aquaculture* 250(3-4): 542-554.

Napolitano, Guillermo E., Robert G. Ackman, and Walisundara Ratnayake. "Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae." *Journal of the World Aquaculture Society* 21.2 (1990): 122-130.

Naylor, R., R. Goldberg, J. Primavera, N. Kautsky, M. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney and M. Troell (2000). "Effect of aquaculture on world food supplies." *Nature* 405(6790): 1017-1024.

Norsker, N.-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H. 2011. Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnol. Adv.*, 29, 24-27.

Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1), 1-9

Pereira, S. L., Leonard, A. E., Huang, Y. S., Chuang, L. T., & Mukerji, P. (2004). Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω 3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochemical Journal*, 384(2), 357-366..

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

Posten, C., and **Schaub, G.** 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--A process view. *J. Biotechnol.*, 142, 64-69.

Pulz O. and **Gross W.** (2004) "Valuable products from biotechnology of microalgae". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 635-648

Pulz O. P. (2001) "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3): 287-293

Pulz O., Gross W. (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6), 635-648 pp.

Pulz, O., Scheibenbogen, K., Groß, W. (2008) Biotechnology with Cyanobacteria and Microalgae. in: Biotechnology Set, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 105-136

Pulz, O.P. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 287-293.

Ramluckan, Krishan, Kandasamy G. Moodley, and Faizal Bux (1997). "An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method." Fuel 116 (2014): 103-108.

Ratledge, Colin. "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production." Biochimie 86.11 (2004): 807-815.

Razon L. F. (2012) "Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria". Bioresource Technology, 107(0): 339-346

Razon L. F. and **Tan R. R.** (2011) "Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: Haematococcus pluvialis and Nannochloropsis". Applied Energy, 88(10): 3507-3514

Razon, L.F. 2012. Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. Bioresour. Technol., 107, 339-346.

- Razon, L.F., and Tan, R.R.** (2011) Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Appl Energ*, 88, 3507-3514.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., & Olsen, Y.** (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(1), 207-221.
- Reynolds C. S.** (2006) "The ecology of phytoplankton". Cambridge University Press
- Richmond, A.** 1992. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *J. Appl. Phycol.*, 4, 281-286.
- Richmond, A.** 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycolgy, Blackwell Science Ltd. Oxford, pp. 566.
- Ryckebosch, Eline, Koenraad Muylaert, and Imogen Foubert.** "Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89.2 (2012): 189-198.
- Sargent, J., D. Tocher and J. Bell** (2002). The lipids. Fish nutrition. J. Halver and R. Hardy. San Diego, USA, Academic Press: 181-257.
- Sargent, J., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher and A. Estevez** (1999). "Recent
- Seguineau, C., Laschi-Loquerie, A., Moal, J., & Samain, J. F.** (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquaculture International*, 4(4), 315-324.
- Shields, R. J., & Lupatsch, I.** (2012). Algae for Aquaculture and Animal Feeds, 23–37.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. (2006) "Commercial applications of microalgae". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87-96

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

Sukenik, A., D. Bilanovic, and G. Shelef. "Flocculation of microalgae in brackish and sea waters." *Biomass* 15.3 (1989): 187-199.

Tacon, A. G. J. and M. Metian (2008). "Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects." *Aquaculture* 285(1-4): 146-158.

Tacon, A., M. Hasan and R. Subasinghe (2006). "Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications." *FAO Fisheries Circular* 1018: 99.

Tanskanen, A., J. R. Hibbeln, J. Hintikka, K. Haatainen, K. Honkalampi and H. Viinamaki (2001). "Fish consumption, depression, and suicidality in a general population." *Archives of General Psychiatry* 58(5): 512-513.

Thompson, P. A., Guo, M. X., Harrison, P. J., & Whyte, J. N. (1992). Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28(4), 488-497.

Thompson, P. A., Ming-xin Guo, and Paul J. Harrison. "Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton." *Journal of Phycology* 28.4 (1992): 481-488.

Tocher, D. (2003). "Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish." *Reviews in Fisheries Science* 11(2): 107-184

Tsakona, S., Skiadaresis, A. G., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2016). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food chemistry*, 198, 85-92.

Turchini, G. M., B. E. Torstensen and W. K. Ng (2009). "Fish oil replacement in finfish nutrition." *Reviews in Aquaculture* 1(1): 10-57.

Turchini, G. M., D. S. Francis and S. S. D. Silva (2007). "Finishing diets stimulate compensatory growth: results of a study on Murray cod, *Maccullochella peelii*." *Aquaculture Nutrition* 13(5): 351-360.

Wen ZY, Chen F. 2003: Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21: 273-294.

Wiessner W., Schnepf E. and Starr R. C. (1995) "Algae, Environment Human Affairs". Bristol, UK, Biopress Ltd

Wikfors GH (1986) Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquac* 59:1-14.

Worm, B., E. B. Barbier, N. Beaumont, J. E. Duffy, C. Folke, B. S. Halpern, J. B. C. Jackson, H. K. Lotze, F. Micheli, S. R. Palumbi, E. Sala, K. A. Selkoe, J. J. Stachowicz and R. Watson (2006). "Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services." *Science* 314(5800): 787-790.

Young, G. and J. Conquer (2005). "Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders." *Reproduction Nutrition Development* 45(1): 1-28.

Zhu CJ and Lee YK (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* 9:189-194.

Βεργίνη Σ. 2014. Καλλιέργεια μικροφυκών σε προσομοιωμένα επεξεργασμένα λύματα και συλλογή τους με χρήση κροκιδωτικών και μαγνητικών υλικών.

Καραπαναγιωτίδης Ι. (2016) Τεχνολογία Ιχθυοτροφών. Σημειώσεις μαθήματος

Καραπαναγιωτίδης Ι. (2017) Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών. Σημειώσεις μαθήματος

Μάρκου Γιώργος, Ιωάννης Τζοβενής, και Ηλίας Θ. Νερατζής. (2015) "Μικροφύκη.",

Μεντέ Ε. και Νέγκας Ι. (2011) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, Κεφάλαιο 5, Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης σελ. 163 – 250.

Ρουσσομουστακάκη Μ, Στασινάκης Π και Τσιάμης Κ (2007) Γνωρίζοντας τα φύκη. Έκδοση της Ελληνικής Φυκολογικής Εταιρείας

ΣΕΘ Ετήσια Έκθεση για το 2016

https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_2016.pdf

ABSTRACT

This study is a review of the use of microalgae as an alternative source of fat and fatty acids in fish feeds. This thesis describes the question of the use of fish oil in fish feeds and the alternative sources of used, such as vegetable oil, in the production of fish feed today. In addition, the main groups of microalgae and the mechanisms they use to develop are described. It also assays, the composition of microalgae in macronutrients and fatty acids, and their role in the aquaculture industry today. Finally, the results of laboratory analyses made in the species *Botryococcus braunii* and *Chlorella vulgaris* with various extraction methods, solvent and extraction time, are presented to contradict these parameters in the efficiency of total fats extraction.

Key words: *Microalgae, Botryococcus braunii, Chlorella vulgaris, PUFA, HUFA, fat and fatty acids, fish feeds, fish oil, sustainable aquaculture*