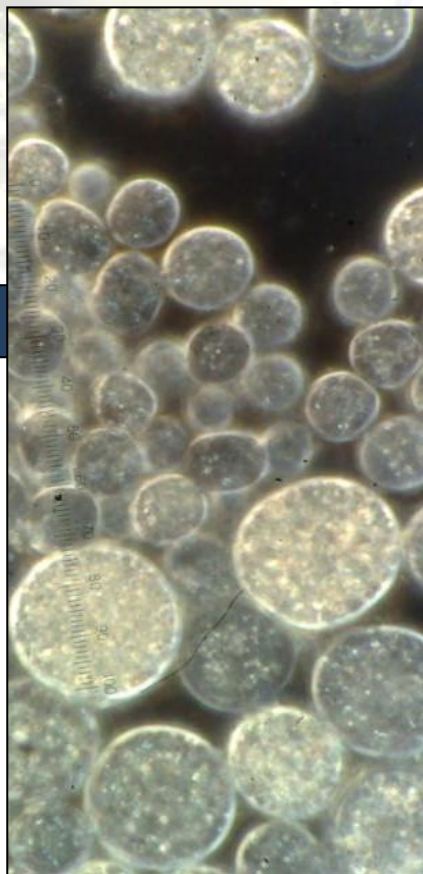


BioPol ehf.
Sjávarlíftæknisetur
Marine Biotechnology Station
545 Skagaströnd
Iceland

<http://biopol.is>



Framleiðsla á fjölómettuðum omega-3 fitusýrum og lífvirkum efnum með frumverum (Thraustochytriaceae).



Sigurður Baldursson; BioPol ehf og Háskólinn á Akureyri
Hjörleifur Einarsson, Háskólinn á Akureyri
Kristinn P. Magnússon, Náttúrufræðistofnun Íslands
Arnheiður Eypórsdóttir, Háskólinn á Akureyri

Lokaskýrsla til AVS 2011
Tilvísunarnúmer AVS: R 047-10

Einfrumungarannsóknir
Skýrsla BioPol 01-11
Október 2011

Titill / Title		Framleiðsla á fjölómettuðum omega-3 fitusýrum og lífvirkum efnum með frumverum (Thraustochytriaceae)
Höfundar / Authors		Sigurður Baldursson, BioPol ehf og Háskólinn á Akureyri (HA) Hjörleifur Einarsson, Háskólinn á Akureyri. Kristinn P. Magnússon, Náttúrufræðistofnun Íslands og HA Arnheiður Eypórsdóttir, Háskólinn á Akureyri.
Skýrsla / Report nr.	Útgáfudagur / Date	22.nóvember 2011
Styrktaraðilar/Funding AVS		
Ágrip á íslensku:	Markmið þessa verkefnis var að einangra og rækta frumverur af ættinni Thraustochytriaceae. Sjávarsýnum var safnað og voru einangraðir 39 stofnar. Frumverurnar voru ræktaðar við 25°C í 4 til 7 daga. Stofnarnir nýttu bæði glúkósa og glyceról sem kolefnisgjafa. Heildarfitumagn var um 10 % af þurrvigti. Þurrvigt var mest 3,92 g/L. Hlutfall fitusýranna,DHA (C22:6-n3), DPA (C22:5-n6) , EPA (20:5n-3) og ARA (20:4-n6) var mest 37,5 %, 5,4 %, 6,2% og 19,7 í sömu röð. Magn karótenóíða var mest 371 µg/g þurrvigti. Í þessu verkefni tókst í að einangra og greina tegund af ættkvíslunum <i>Thraustochytrium</i> og í fyrsta skipti af tegundinni <i>Sicyoidochytrium</i> úr sjó við Ísland (<i>Thraustochytrium kinnei</i> og <i>Sicyoidochytrium minutum</i>). Niðurstöðurnar hvetja eindregið til frekari athugana eins og vaxtartilrauna á þessum frumverum á stærri skala.	
Lykilorð á íslensku:	Smáþörungar, fjölómettaðar fitusýrur, <i>Thraustochytrids</i> , DHA	
Summary in English:	The main objective of this project was to isolate and culture protista of the Thraustochytriaceae family. Sea-samples were collected and pure cultures of 39 strains of Thraustochytrids were isolated. The microalgae were cultivated at 25°C for 4 to 7 days. The strains used glucose and glycerol as carbon sources. Total lipid content was approximately 10% of biomass dry weight. Highest dry weight was obtained at 3,92 g/l. Fatty acid composition of DHA (C22:6-n3), DPA (C22:5-n6) , EPA (20:5n-3) and ARA (20:4-n6) were highest at 37,5 %, 5,4 %, 6,2% and 19,7 respectively. Concentration of carotenoids was highest 371 µg/g. <i>Thraustochytrium kinnei</i> ,and for the first time, <i>Sicyoidochytrium minutum</i> have been isolated and identified from Icelandic waters. These results encourage further studies of the strains and production on a bigger scale.	
Keywords:	Microalgae, polyunsaturated fatty acids, <i>Thraustochytrids</i> , DHA	

Efnisyfirlit

Efnisyfirlit.....	1
1 Inngangur	3
1.1 Ræktun og nýting ófrumbjarga einfrumunga (frumvera).	3
1.2 Framleiðslugeta Thraustochytrids.....	6
1.3 Markmið	6
2 Efni og aðferðir	7
2.1 Undirbúningur.	7
2.2 Sýnataka.	7
2.3 Einangrun og hreinræktun Thraustochytrids stofna.	7
2.4 Stofnasafn, viðhald og geymsla.....	7
2.5 Lífmassa-, fitusýru- og litarefnagreiningar.	7
2.6 Tegundagreining á Thraustochytrids með erfðagreiningu.....	8
2.7 Könnun á áhrifum mismunandi næringarefna á vöxt.	8
3 Niðurstöður og umræða.....	10
3.1 Einangrun.....	10
3.2 Þurrvigt og fitusýruframleiðsla.....	10
3.3 Mælingar á áhrifum næringarefna á vöxt.	15
3.4 Mælingar á litarefnum.....	18
3.5 Raðgreining og flokkun.....	18
4 Samantekt og lokaorð	19
4.1 Samantekt.....	19
4.2 Lokaorð.....	20
5 Þakkir	20
6 Heimildir	21
7 Viðaukar.....	26
7.1 Viðauki 1. DNA raðir úr raðgreiningu.	26
7.2 Viðauki 2. Sýnatökustaðir.....	27

Myndaskrá

Mynd 1. Þurrvigt (g/L) í ræktum einstakra stofna	11
Mynd 2. Heildarfita stofna (%)	11
Mynd 3. Dæmi um niðurstöður greiningar með í gasgreini	12
Mynd 4. Hlutfall þekktra og óþekktra fitusýra í stofnum.	12
Mynd 5. Hlutfall (%) fitusýra innbyrðis í stofnum.	13
Mynd 6. Hlutfall fitusýra C20 til C24 í einstökum stofnum.	14
Mynd 7. Vöxtur og áhrif vaxtarþátta á lífmassamyndun (Stofn 5).....	16
Mynd 8. Áhrif mismunandi kolefnis- eða köfnunarefnisgjafa á lífmassamyndun stofna 11 og 14.	17
Mynd 9. DNA magnað úr stofnum 1-9, rafdregið á 0,8% agarósageli.	18

Töfluskrá

Tafla 1. Framleiðslugeta Thraustochytrid stofna (Barclay o.fl. 2005)	6
Tafla 2. Vísar („primers“) notaðir í PCR og raðgreiningu.....	8
Tafla 3. Dæmi um gildi vaxtarþátta í PB ræktun.....	9
Tafla 4. Vöxtur stofns 5 við mismunandi næringarlegar aðstæður.....	15

1 Inngangur

Fram á miðja 20. öldina var litið á hafið sem óþrjótandi forðabúr matar fyrir mannkynið allt. Annað kom þó á daginn og nú er ljóst að fiskistofnar heimshafanna eru flestir ef ekki allir fullnýttir og margir hverjir að kikna undan veiðialagi. Til að bregðast við þessari þróun hefur verið lögð áhersla á að bæta nýtingu, ýta undir vöruþróun og meiri áhersla hefur verið lögð á frekari vinnslu aukaafurða. Á sama tíma hefur mátt sjá mikla aukningu á framboði afurða úr á fiskeldi. Nú er svo komið að um helmingur alls fisks og skelfisks sem neytt er í heiminum kemur beint úr fiskeldi en það hefur einnig sína fylgikvilla. Á síðustu 10 árum hefur hlutfallið af heimsframleiðslu á lýsi og fiskimjöli sem fer til fiskeldis tvöfaldast og fara nú 68% af fiskimjöli og 88% af fiskiolíu til framleiðslu á fiskifóðri (Naylor o.fl 2009), þetta mætir vaxandi gagnrýni og til að framleiðsla í fiskeldi geti aukist þarf að finna aðra og viðunandi endurnýjanlega uppsprettu af fiskiolíu. Ekki er hægt að byggja aukninguna á olíu úr landplöntum þar sem í þá olíu vantar fjölmætтуðu fitusýrurnar DHA (Docosahexaenoic acid C22-6n3) og EPA (Eicosahexaenoic acid C22-5n3).

Þó fiskistofnar heimshafanna séu fullnýttir er ekki þar með sagt að allir nýtingarmöguleikar sjávar hafi verið að fullu reyndir. Á síðustu 30-40 árum hefur mikið af nýjum efnum verið einangrað úr sjávarlífverum og mörg þeirra reynst vera lífvirk og því með mikla nýtingarmöguleika í matvæla-, fóður- og lyfjaiðnaði. Einnig hefur færst í vöxt að menn rækti ýmsar smærri lífverur úr sjó, s.s þörungum, bakteríum og frumverum og nýti þær beint til framleiðslu á ákveðnum efnum og afurðum, t.d próteinum og fitu (Ratledge 2004). Í því sambandi má nefna framleiðslu á omega-3 sjávarolíum (í stað lýsis) með frumverum af ættinni Thraustochytriaceae (Barclay o.fl. 2005), sem er ört vaxandi iðnaður. Með þessu er verið að stíga skref niður í fæðukeðjunni og framleiða næringarefni á sjálfbæran hátt. Einnig hefur það sýnt sig að margar tegundir þessara frumvera hafa mjög jákvæð áhrif á vöxt og viðgang sjávarlífrifa og getur því ræktun þeirra til fóðurs gagnast t.d þorsk- og lúðveldi. Fleiri efni eru einnig framleidd með hjálp slíkra einfrumunga og má þar nefna ensím, squalen og litarefni. Takmörkuð þekking er á þessum lífverum á Íslandi en Háskólinn á Akureyri hefur í samstarfi við BioPol ehf verið að byggja upp þekkingu og færni á þessu sviði.

1.1 Ræktun og nýting ófrumbjarga einfrumunga (frumvera)¹.

Ófrumbjarga lífverur eins og frumverur (e. protista) nýta lífræna kolefnisgjafa eins og glúkósa, glyceról, acetat eða sykrur eins og sterkju til orkuöflunar í stað þess að fanga ljósorku og má því rækta þá í myrki í ræktunartönkum. Nokkrir þörungar hafa þennan

¹ Nafngiftir og flokkunarfræði þessara lífvera (Thraustochytriaceae) er nokkuð á reiki og hafa tekið breytingum á undanföllum árum. Þær hafa áður verið taldar með sveppum en einnig smáþörungum. Hér er notað hugtakið „frumvera“ sem er nokkuð hlutlaust í þessu samhengi. Höfundar hafa einnig notað „Traustar“ sem er mun þjálla en latneska nafnið.

eiginleika og geta skipt frá ljóstillífun yfir í ófrumbjarga vöxt og nokkrir hafa misst eiginleikann til að ljóstillífa og vaxa einungis með ófrumbjarga hætti eins og frumverur í hópi Thraustochytrids (Gould, Waller, McFadden 2008, Archibald 2009, Perez-Garcia o.fl. 2011).

Lífverur af ættinni Thraustochytriaceae eru ófrumbjarga („straminipilan protists“) og lifa einungis í sjó (Raghukumar 2002 og 2008). Áætlaður lífmassi þeirra er 0,0026 mg C/L sjó (Kimura, Fukuba, Naganuma 1999) svipaður og baktería og er álitíð að þeir hafi miklu hlutverki að gegna við niðurbrot lífræna leifa í hafinu (Raghukumar 2002). Hátt magn ómega-3 fitusýra í þessum einfrumungum gefur til kynna að þeir gegni mikilvægu hlutverki í fæðukeðju hafsins (Raghukumar 2002, Nagano o.fl. 2011).

Thraustochytrids hafa verið ræktaðir í Bandaríkjunum síðan 1987 vegna mikils fituinnihalds og eftirsóknarverðrar fitusýrusamsetningar. Stofn af ættkvíslinni *Schizochytrium* hefur einkum verið notaður og hafa þó nokkur einkaleyfi verið skráð til að vernda þessa framleiðslu og notkun lífverunnar (Barclay 1992, 2006, 1991, 1994 a) og b), 1999 og 2002; Patell og Rajashri 2007, Tanaka o.fl. 1998, Yokochi o.fl. 2003 og 1996, Piechocki og Torrance 2007). Sum þessara einkaleyfa eru runnin út en önnur renna út í júlí og október 2012. Framleiðslan hefur verið í umsjón Martek (<http://www.martek.com/>) í Bandaríkjunum frá árinu 2002 eftir að það keypti fyrirtækið OmegaTech. Martek hefur einnig notað smápörunginn *Cryptocodinium cohnii* frá árinu 1990 til að framleiða fjólómettaðar fitusýrur til manneldis samanber einkaleyfi þar um frá árinu 1991 (Kyle, Reeb, Sicotte 1991).

Framleiðsla á sjávarolíum hefur einnig verið hjá fyrirtækinu Lonza í Þýskalandi sem keypti framleiðslurétt á DHA með Thraustochytrids frumverum af fyrirtækinu Nutrinova í Þýskalandi árið 2006 (Patton 2005). Þar er notuð ættkvíslin *Ulkenia* sem tilheyrir einnig Thraustochytrids.

Við ræktun frumveranna myndast lífmassi sem inniheldur eftir þurrkun um 10 til 18 % DHA og EPA. Slíkan lífmassi má nota beint sem fóður fyrir artemíur og hjóldýr, (Garcia, Parrish, Brown 2008, Barclay og Zeller 1996) sem aftur eru notuð sem fóður fyrir fisklirfur og seiði. Við eldi sjávarfiska er mikilvægt að hafa rétt hlutföll af DHA og EPA í fóðri. Einnig má nota lífmassann sem íblöndun í fiskifóður stærri eldisfiska í stað fiskimjöls eða fiskiolíu. Sumar tegundirnar mynda einnig karótenóíða sem mætti nýta.

Draga má fituna út úr lífmassanum og fá hreina olíu án fiskilyktar og þeirra snefilefna og þungmálma sem olía úr veiddum fiski inniheldur. Olían sem þá fæst getur innihaldið allt að 40% DHA og hana má markaðssetja sem fæðubótaefni t.d. í barnamat eins og MARTEK í USA gerir.

Eins og fyrr sagði hefur markaður fyrir fituafurðir úr Thraustochytrids (t.d. DHA og EPA) vaxið í tengslum við fóður en á síðari árum hafa myndast nýir markaðir vegna aukinnar þekkingar á

eiginleikum olíunnar. Minni hættu er á að aðskota- eða aukefni séu til staðar eins og í lýsi sem unnið er úr sjávarfangi. Þetta helgast m.a. af stöðluðum framleiðsluáðstæðum og vel skilgreindum hráefnum. Nú er svo komið að nær allar EPA og DHA fitusýrur sem bætt er í barnamat í USA koma úr *Thraustochytrids*. Þá eru þessar olíur settar í fóður til fiskeldis og til að til að auðga fóður kjúklinga og svína.

Verðmæti markaðarins má sjá á kaupþilboði í framleiðslueiningu Marteks á DHA og EPA, en fyrirtækið Royal DSM í Hollandi hefur boðið 1,1 milljarð dollara í þessa einingu. Allt bendir því til að eftirspurn eftir DHA og EPA fari vaxandi.

Að minnsta kosti þrjár tækniyfirfærslur (technology transfer) frá rannsóknarstofu yfir í framleiðslufyrirtæki á *Thraustochytrids* fituframleiðslu hafa átt sér stað síðastliðin 5 ár. Auk þess hafa 2-3 aðrir aðilar hafið framleiðslu og sölu á *Thraustochytrids* olíu í smáum skala. Varan er þá jafnan markaðssett á internetinu (Anon 2011, vefheimild). Árið 2007 varð tækniyfirfærsla frá rannsóknastofnunum innan CSIR² á Indlandi til fyrirtækisins Avestha Gengraine Technology varðandi fitusýruframleiðslu með *Thraustochytrium* stofninum SC-1. Greiddar voru um 37 milljónir íslenskra króna fyrir stofninn og framleiðsluleyfið ((Anon á.d., vefheimild). Árið 2009 varð tækniyfirfærsla frá líftæknistofnun NCKU³ á Taiwan til fyrirtækisins Vedan International á *Aurantiochytrium* stofninum BL-10 (Anon 2009a). Greitt var fyrir tækniþekkinguna með 25 milljónum NTD⁴ árið 2009 (Chen, Lu, Chen 2009, vefheimild).

Fyrirtækið Ocean Nutrition Canada birti vísindagrein árið 2006 um *Thraustochytrid* stofninn ONC-T18 (Burja o.fl. 2006) og hefur síðan sótt um einkaleyfi á ensímum úr stofninum (Burja o.fl. 2007, Burja, Girouard, Radianingtyas 2009). Kanadíska ríkisstjórnin hefur sett af stað verkefni um endurnýjanlega orkugjafa, þar á meðal er verkefni um nýtingu *Thraustochytrium* stofnsins ONC-T18B (Demonstration of ONC T 18 B for Biofuel) til framleiðslu á lífdíselsel (Anon 2010; Hamilton 2010 vefheimildir). Grein um þetta birtist í NY Times þann 29. september 2010 (Brenhouse 2010, vefheimild).

Jarðolíufyrirtækið BP og Martek hafa gert með sér samning um að þróa *Thraustochytrids* til framleiðslu á fitu til umbreytingar í díselolíu. BP leggur í upphafi til \$ 10.000.000 samkvæmt samningi frá ágúst 2009 (Anon 2009b vefheimild). Þetta átak kallast "Sugar to Diesel" (Apt 2010 vefheimild).

Hér á landi hafa *Thraustochytrid* einfrumungar ekki verið notaðir til framleiðslu á sjávarolíu og væri slíkt verkefni dæmi um nýjung og nýsköpun. Fá fyrirtæki í heiminum hafa hingað til notað *Thraustochytrids* til framleiðslu á sjávarolíu en nú eru mörg framleiðslueinkaleyfi að renna út. Því er líklegt að aðrir reyni að nýta sér þessa stöðu til að til að koma vörum, sem

² Council of Scientific & Industrial research, Indlandi

³ National Cheng Kung University, Taiwan

⁴ New Taiwan Dollar. 1 NTD um 0,03 USD (október 2011)

eru unnar úr *Thraustochytrids*, á markað. Það eru fyrst og fremst vörur sem byggja á löngu fjölmömettuðu fitusýrurunum DHA, EPA og ARA (Arachidonic acid, C20-4n-6) .

1.2 Framleiðslugeta *Thraustochytrids*.

Framleiðslugeta *Thraustochytrid* frumveranna eru gerð skil í kafla 3 í bókinni "Single Cell Oil" og er Tafla 1. fengin þaðan (Barclay o.fl. 2005). Í töflunni kemur fram að með þróun í ræktunartækni og kynbótum á lífverunum hefur verið unnt að tífalda framleiðni á DHA . Í einkaleyfinu frá 1992 fékkst 0,05 g/L/klst en þar var notast við 14 lítra ræktunartank.

Framleiðnin hefur síðan aukist í 0,45-0,55 g/L/klst og er komin í stórskala framleiðslu í 10 þúsund lítra tanki. Lokaniðurstaða er því 40-50 g af DHA per líter af ræktunaræti.

Thraustochytrid stofnar hafa mismunandi framleiðslugetu og eru kenningar uppi um að þeir sem koma frá heittempruðum hafsvæðum framleiði meiri lífmassa en lægra hlutfall DHA fitusýru en stofnar einangraðir frá kaldtempruðum svæðum (Rosa, Galvagno, Velez 2011, Bowles o.fl. 1999).

Hér ber að líta á að hægt er auka framleiðslugetu stofna með kynbótum eða aðferðum iðnaðarörverufræði (Lian o.fl. 2010). Einnig hefur ræktunarhitastig áhrif á hlutfall DHA í fitusamsetningu, en það er hærra í stofnum sem eru ræktaðir við 15°C heldur en 25-30°C (Taoka o.fl. 2009).

Tafla 1. Framleiðslugeta *Thraustochytrid* stofna (Barclay o.fl. 2005)

Major Scale-Up	DHA	DHA	DHA in Lipid	DHA in Oil	Cells	Productivity
Process Changes	Cell (g/L)	Titer (g/L)	(% FAME)	(% FAME)	(% dry wt)	(g/L/h)
Initial lab scale, U.S. Patent 5,130,242 (1992).	21	2	39	26	10	0,05
Scale-up, 10,000 L scale	40	4	35-40	25-28	8-12	0,07
Low chloride + ammonium sulfate as nitrogen source	65-70	8	35-40	32	10-13	0,1
Fed batch + low DO	170-210	40-50	50-73	35-45	22-25	0,45-0,55

1.3 Markmið

Markmið verkefnisins var að rækta upp og einangra frumverur af ættinni

Thraustochytriaceae og leita fyrst og fremst stofna með hátt hlutfall hinna eftirsóttu ómega-3 fitusýra DHA og EPA, en skima einnig fyrir litarefnum (karotenoíðum).

2 Efni og aðferðir

2.1 Undirbúningur.

Verkefnið var undirbúið á árinu 2009 að hluta til með upplýsingaöflun, sýnatöku og tilraunum með einangrun á stofnum. Meginhluti verkefnisins var unninn árið 2010.

2.2 Sýnataka.

Sjósýni og sýni úr fjörum voru sótt í 1 L plastbrúsa eða ½ L dauðhreinsaðar glerflöskur. Sýni sem tekin voru úr fjöru samanstóðu af ýmsum gerðum þangs og þara ásamt sandi, sjó og grjóti. Sýnum var safnað frá júní 2009 til júní 2010 (sjá [viðauka 2](#)). Alls voru sýni tekin á 24 stöðum.

Sýni til einangrunar á Thraustochytrids voru meðhöndluð í aðalatriðum á fernen hátt:

- 1) Þang og steinar voru skoluð með dauðhreinsuðum 30 % sjó og skolið sett í næringaræti
- 2) Sjósýni sett í frjókornaæti a (30 % dauðhreinsaður sjór með furufrjókornum)
- 3) Sjósýni sett í frjókornaæti b (100% dauðhreinsaður sjór með furufrjókornum)
- 4) Furufrjókorn voru sett beint út í sjósýni með þangi/þara og sandi.

2.3 Einangrun og hreinræktun Thraustochytrids stofna.

Til að rækta upp Thraustochytrids stofna var „GPY“ agar notaður sem æti. Samsetning ætisins var eftirfarandi: Yeast extract 1 g/L, peptone 1g/L, glukósi 2g/L, agar 14 g/L leyst í sjó (60%) og kranavatni (40%). Til að hindra bakteríuvöxt í ræktunum var penicillini og streptomycini bætt út í frjókorna- og agarætin með lokastyrk 0,3 g/L og 0,5 g/L í sömu röð. Fylgst var með vexti á agarskálum og í frjókornaætum í allt að 15 daga. Kólóníur á agarskálum voru skoðaðar í víðsjá og frumur í smásjá. Ef vöxtur sást á furufrjókornum var 1-2 lykkjum af ræktinni strikað á aðlagð GPY æti og fylgst með vexti kólónía. Líklegum Thraustochytrids kólóníum var strikað áfram nokkrum sinnum á sama æti til að fá hreinrækt.

2.4 Stofnasafn, viðhald og geymsla.

Hreinræktuðum stofnum var viðhaldið með strikun á GPY agar, ræktað við 25°C og geymt við 12°C. Til langtíma geymslu (stofnasafn) voru stofnarnir frystir í GPY vökvaæti bæði með 12 % og 20% glyceróli við -80°C. Einnig voru þurrkaðar frumur varðveittar við -80°C.

2.5 Lífmassa-, fitusýru- og litarefnagreiningar.

Kólóníum af agarskál var sáð í 50mL Erlenmeyerflöskur með 10 mL ræktunaræti og ræktað í 3-5 daga, síðan var sáð yfir í 250mL Erlenmeyerflöskur með 50mL ræktunaræti og ræktað í 4 til 7 daga. Stofnarnir voru ræktaðir við 25°C og 150 snúninga hristing á mínútu (rpm). Vöxtur var ákvarðaður með þurrvigt fruma („dry cell weight“), þar sem 50mL rækt var spunnin niður við 6000g, þvegin tvisvar með 30ml af dauðhreinsuðu vatni, þurrkuð og afurðin vegin. Þurrkun var ýmist gerð í þurrskáp við u.þ.b. 105°C í 16 klst eða undir innrauðum lampa í Mettler LJ16 Moisture Analyser.

Fitusýrugreining var framkvæmd á þurrkuðum frumum. Notuð var AOCS Official Method Ce 1b (1989) með minniháttar breytingum. Greiningarnar voru framkvæmdar hjá Matís ohf, Reykjavík (c/o Heiða Pálmadóttir).

Heildarmagn karótenóíða í frumum var ákvarðað af Sigbóri Péturssyni við Háskólann á Akureyri. Litarefnin voru dregin út með acetoni úr 50 mL ræktum og mæld með ljósgleypnimælingu við 474 nm. Sama sýni var einnig sett á HPLC súlu til aðgreiningar á karótenóíðum.

2.6 Tegundagreining á Thraustochytrids með erfðagreiningu.

Við tegundagreiningu á frumverum úr hreinræktum var 18S rRNA genið raðgreint og “strikamerkt” með svokallaðari DNA barcoding aðferð.

Sökum hás fituinnihalds gekk erfiðlega að einangra erfðaeftirbrot úr kjarna úr ræktum af Thraustochytrids. Bestu útkomu gáfu einangrunarkit fyrir bakteríur (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit) og phenol chloroform útdráttur að undangenginni meðhöndlun með sundrunarbufferlausn (0,25M Tris-Cl, 0,1M EDTA, 2% w/v SDS og 0,1M NaCl, pH 8,2) skv. (Mo and Rinkevich 2001). DNA var einangrað með síðarnefndu aðferðinni úr stofnum 10, 11, 12, 13, 14 og 17, og úr stofnum 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 34, 36, 37, 38 og 39 með UltraClean settinu.

Úr afurðunum var 18S rDNA genið magnað í PCR með 18SOO1F og 18S13R vísur sem mynda ca. 1700 bp afurð (Honda o.fl. 1999) með eftirfarandi hitaferli: Upphafshitun 94°C í 5 mín. 30 hringir af: 94°C í 45 sek, 62°C í 30 sek og 72°C í 90. Endað á 72°C í 10 mín. Notaður var Teg pólýmerasi frá Matís (Reykjavík, Ísland).

Tafla 2. Vísar („primers“) notaðir í PCR og raðgreiningu.

18SOO1F: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA 3'
18S13R : 5' CCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCT 3'

Staðfesting á PCR fékkst með því að rafdraga afurðina á 0,8% agarósageli með SYBR safe litarefni við 100V í 1 klst. DNA bönd í gelinu sjást þá undir útfjólubláu ljósi sbr. Mynd 9.

PCR afurðin (úr 5 stofnum) var hreinsuð með QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Eftir hreinsun var 7,5µL af afurðinni blandað við 2,5µL af Rv vísu (18S13R) og sýnið þá tilbúið til raðgreiningar. Raðgreining var framkvæmd á Rannsóknarstofu í sameindaerfðafræði, Borgum við Norðurslóð, Akureyri og hjá MacroGen Inc. í Hollandi og voru raðgreiningargögn síðan borin saman við gagnabanka NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) til tegundagreiningar.

2.7 Könnun á áhrifum mismunandi næringarefna á vöxt.

Til að kanna áhrif mismunandi næringarefna á vöxt nokkura Thraustochytrid stofna var notuð tilraunauppsetning kennd við Plackett og Burman frá 1946 (PB). Tafla 3. sýnir dæmi um uppsetningu slíkrar tilraunar.

Stofnar voru ræktaðir í 250 mL Erlenmeyer-kolbum með 50 mL æti þar sem vaxtarþáttum var breytt og lífmassaframleiðsla mæld (sbr kafla 2.5). Hitastig við ræktun var 25°C og hristingur 150 rpm í 4-6 daga. Kolefnisgjafar voru glúkósi eða glyceról. Köfnunarefnisgjafar voru Yeast Extrakt, Peptone eða Tryptone, allt frá BD Difco, rækjuextrakt (SE), humarextrakt (LE) og þorskextrakt (CE) allt frá SERO ehf, Skagaströnd. Ræktunarætið samanstóð af: 10% - 40% síuðum sjó; kolefnisgjafa, köfnunarefnisgjafa og KH_2PO_4 0,2 g/L.

Tafla 3. Dæmi um gildi vaxtarþátta í PB ræktun.

Gildi vaxtarþátta, - = lágt gildi, + = hátt gildi, 0 = miðgildi			
Vaxtarþættir	-	0	+
Síaður sjór % -X1	10	25	40
Glúkósi g/L -X2	10	25	50
Ger extract g/L X3	3	5	8
Peptone g/L - X4	3	5	8
KH_2PO_4 g/L - X5	0,1	0,5	1
Upphafs pH - X6	6	7	8

3 Niðurstöður og umræða.

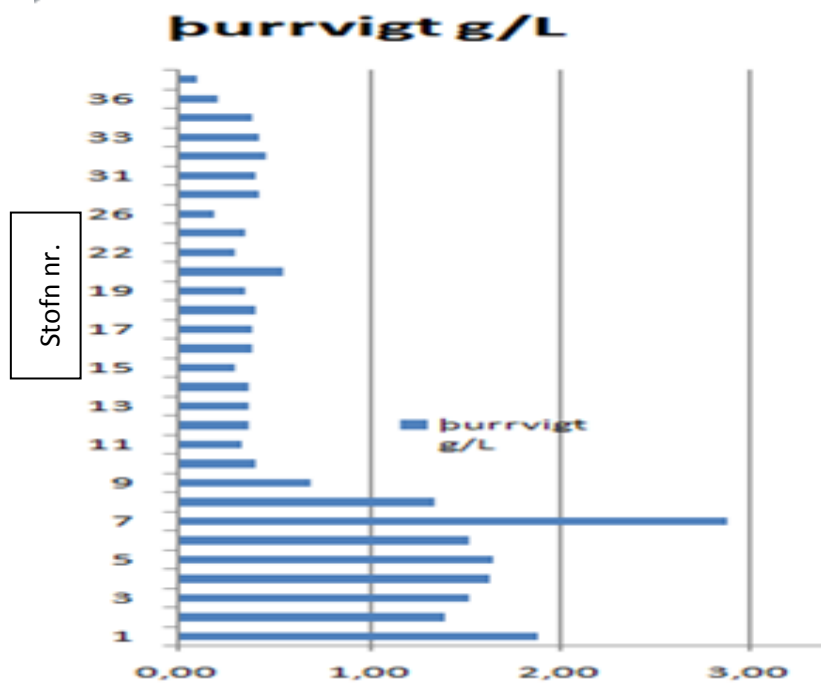
3.1 Einangrun

Thraustochytrid stofnar (39 alls) ræktuðust úr sýnum frá sýnatökustöðum 1 (Skagaströnd), 9 (Hveravík við Dranganes) og 10 (Hverastrytur í Eyjafirði). Stofn 1 ræktaðist úr sýni frá vikinni á Skagaströnd, sem sett var beint á agar-skál án forræktar með furufrjórnunum. Stofnar úr sýnum 9 og 10 ræktuðust eftir forrækt með furufrjórnunum. Rosa, Galvagno og Velez (2011) gerðu úttekt á einangrun Thraustochytrids úr tempruðum og köldum sjósvæðum við Argentínu. Þar kemur m.a. fram að ekki tekst alltaf að rækta Thraustochytrids á agar-skálum þó svo þeir vaxi í forrækt á furufrjórnunum. Einnig kemur fram að í stað þess að nota furufrjórn sem beitu er hægt að nota dauðhreinsaða saltvatnsrækju og er þar mælt með að nota einhverja beitu sem er til staðar á sýnatökustað. Í framhaldsrannsóknum væri æskilegt að gera slíkt t.d. að sía sjó og nota dauðhreinsað svif sem beitu.

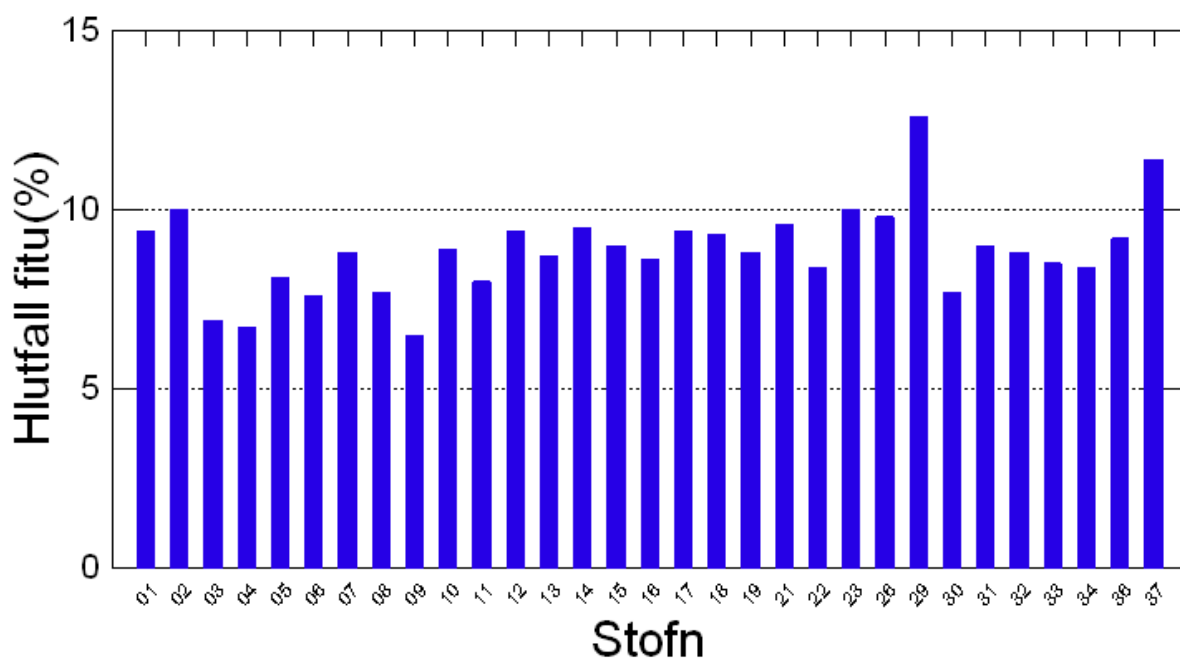
Þrjátíu og níu stofnar voru hreinræktaðir en fjóra tókst ekki að rækta áfram (nr 20, 24, 25 og 27). Stofnar 1 og 7 eru frá sýnatökustað 1 (Skagaströnd), stofnar 2 til 5, 8 og 9 eru frá sýnatökustað 9 (Hveravík við Dranganes) og stofnar 10 til 39 eru frá sýnatökustað 10 (Hverastrytur í Eyjafirði).

3.2 Þurrvgit og fitusýruframleiðsla

Talsverður munur var á myndun lífmassa milli stofna (Mynd 1). Þannig mældist stofn 7 með tæplega 3g/L og stofn 1 með tæplega 2g /L. Þessir stofnar einangruðust nærri Skagaströnd. Aðrir stofnar úr Húnaflóa mynduðu milli 1 og 2 g /L en stofnar af hverastrytunum u.þ.b 0,5 g/L. Ekki er ljóst í hverju þessi munur er fólgin en það verður rannsakað áfram. Heildarfita í þurrmassa allra stofnanna var hins vegar mjög jöfn eða um 10% og var það metið út frá „metýleruðum“ fitusýrum við greiningu í gasgreini (Mynd 2) Mæling á fituhlutfalli mistókst á stofnum 28 og 29.

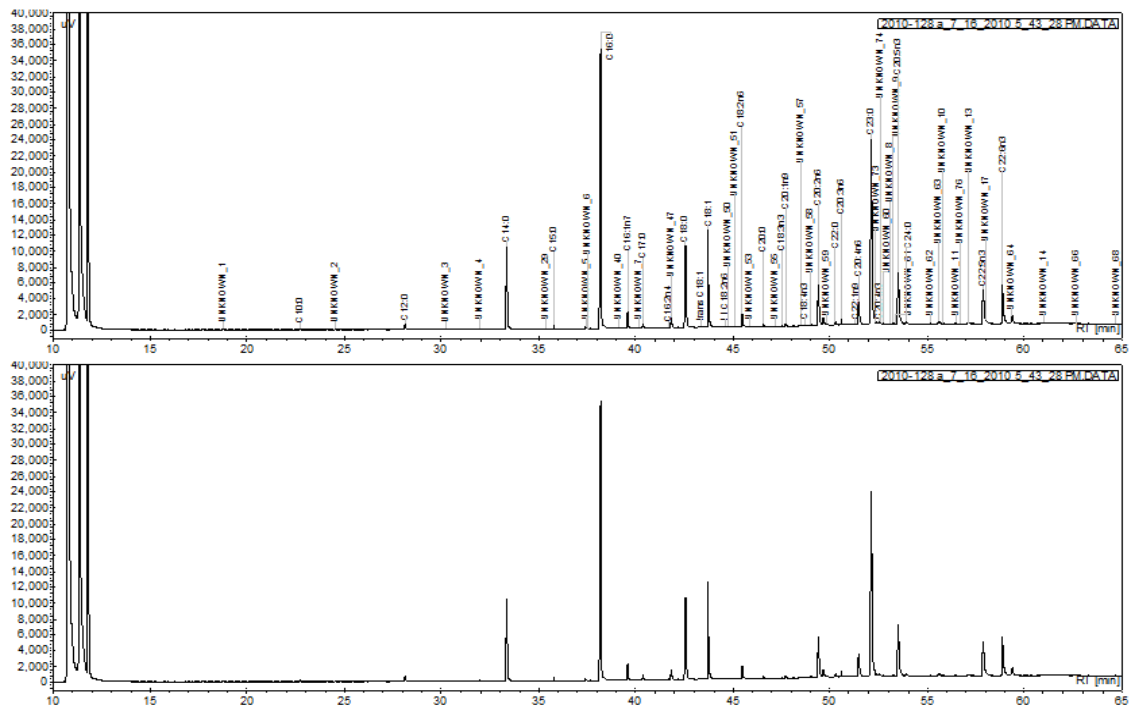


Mynd 1. Þurrvigt (g/L) í ræktum einstakra stofna



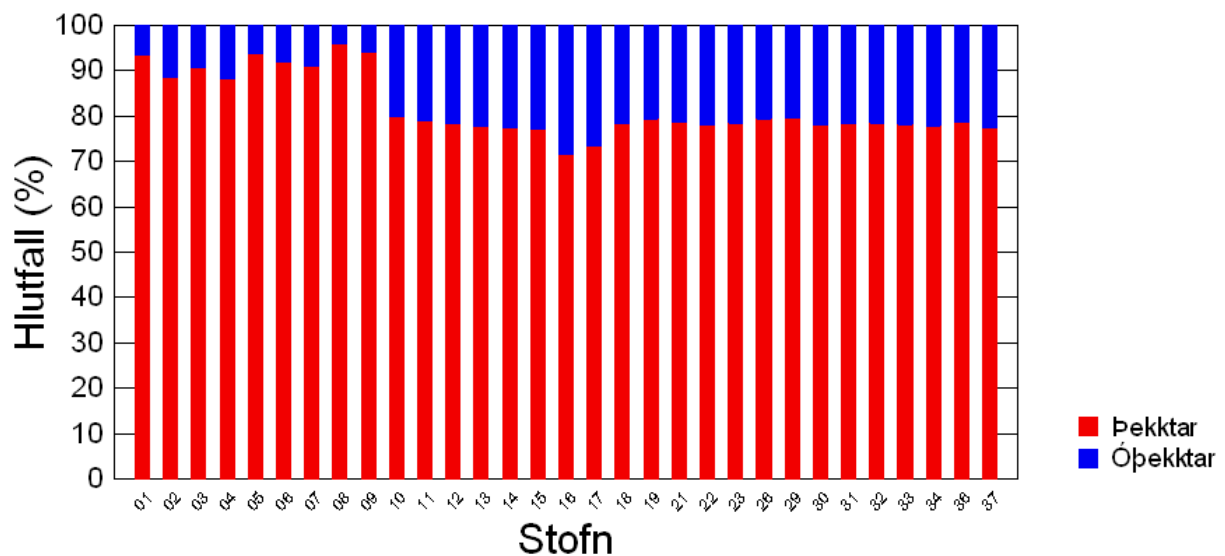
Mynd 2. Heildarfitu stofna (%)

Fitusýrusamsetning var mæld í 30 stofnum. Mynd 3 sýnir dæmi um niðurstöður úr fitusýrugreiningu með gasgreini. Við greininguna var fitusýran C23:0 var notuð sem staðall (2 mg / sýni) eins og myndin sýnir.



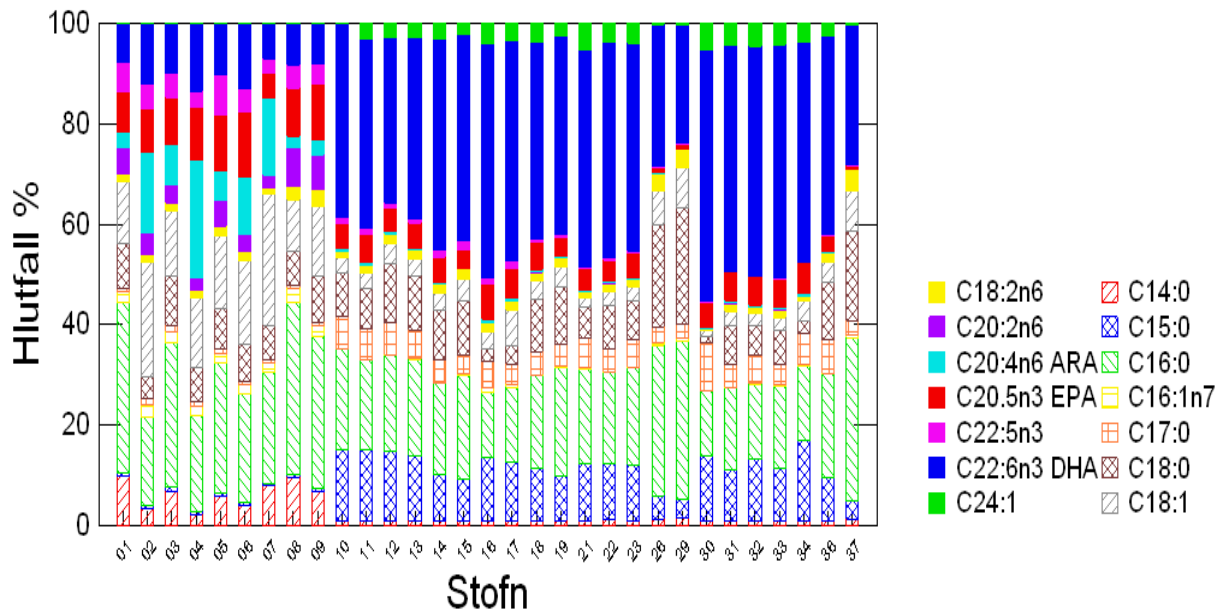
Mynd 3 Dæmi um niðurstöður greiningar með í gasgreini

Vel tókst að greina fitusýrurnar en þó voru óþekktar fitusýrur um 10-20% af magni fitunnar eins og sést á Mynd 4. Betur tókst að greina fitusýrurnar úr stofnum úr Húnaflóa en stofnum af hverastrýtunum.



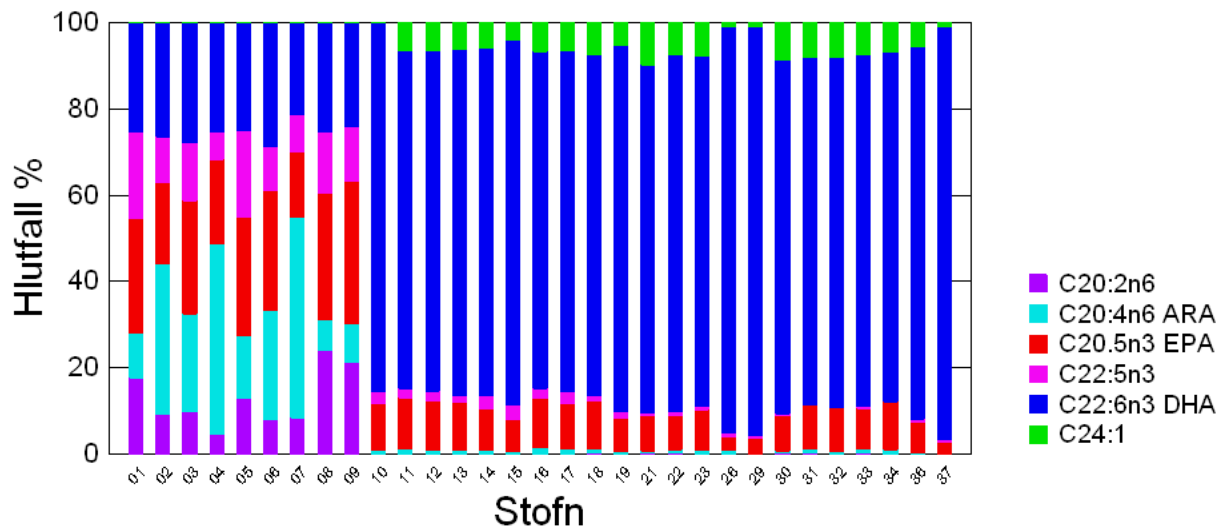
Mynd 4. Hlutfall þekktra og óþekktra fitusýra í stofnum.

Samtals greindust 16 mismunandi fitusýrur í stofnunum en mismargar eftir stofnum (Mynd 5). DHA greindist hæst í stofni 30 eða 37,6% af heildarfitu. EPA greindist hæst í stofni 6 eða 11,2%. ARA greindist hæst í stofni 4 eða 19,7%. Stofn 36 greindist ekki með DHA en aftur á móti 29,7% af 22C:5n3, aðrir stofnar greinast með 22C:5n3 á bilinu 0 - 7,3%. Stofn 36 gæti því verið góður kandidát til framleiðslu á DPA (Docosapentaenoic acid C22-5n3) sem hefur ýmis líffræðileg áhrif á frumustarfsemi (Kanayasu-Toyoda, Morita, Murota 1996).



Mynd 5. Hlutfall (%) fitusýra innbyrðis í stofnum.

Þegar einungis eru athugaðar fitusýrurnar C20 til C24 kemur í ljós að af þeim er hlutfall DHA í stofni 37 97,2% og hlutfall EPA 2,8% (Mynd 6). Rannsóknaniðurstöðunum svipar til annarra sambærilegra rannsókna á einangrun á Thraustochytrid tegunda. Burja o.fl. (2006) einöngruðu Thraustochytrid stofna við Atlantshafsstrendur Kanada og mældu þurrmassa frá 100 til 2.300 mg/L og magn heildarfitu, DHA og EPA var frá 27 til 320, 5 til 84 og 3 til 21 mg/g í sömu röð. Sambærilegar niðurstöður í þessu verkefni eru: Þurrmassi frá 100 til 2.880 mg/L og magn heildarfitu, DHA og EPA var 6,5 til 11,4, 5,6 til 37,6 og 2,7 til 11,2 mg/g í sömu röð. Hér má geta þess að Burja o.fl. (2006) völdu einungis stofna sem höfðu heildarfitu yfir 20% af þurrvigt í sínar rannsóknir en í þessu verkefni var greiningin framkvæmd í öllum stofnum.



Mynd 6. Hlutfall fitusýra C20 til C24 í einstökum stofnum.

Huang o.fl. (2003) flokkuðu sína Thraustochytrids stofna eftir framleiðslumynstri langra fjölmættaðra fitusýra (C20 til C22) og með samanburði á skyldleika 18s rRNA gena. Í ljós komu 5 gerðir af C20 til C22 framleiðslumynstri og erfðafræðileg greining á 18s rRNA féll að framleiðslumynstrinu. Flokkarnir voru þessir:

- 1) DHA/DPA, (C22:6, n-3/C22:5, n-6);
- 2) DHA/DPA/EPA, (C22:6, n-3/C22:5, n-6/C20:5, n-3),
- 3) DHA/EPA, (C22:6, n-3/C20:5, n-3);
- 4) DHA/DPA/EPA/ARA; (C22:6, n-3/C22:5, n-6/C20:5, n-3/C20:4, n-6) og
- 5) DHA/DPA/EPA/ARA/DTA (C22:6, n-3/C22:5, n-6/C20:5, n-3/C20:4, n-6/C22:4, n-6).

Með samsvarandi flokkun íslensku stofnanna út frá á fitusýrum frá C20 til C22 koma eftirfarandi flokkar í ljós:

- A) DHA/DPA/EPA/ARA/EDA (C20:2, n-6, eicosadienoic acid): Stofnar 1,2,3,4,5,6,7,8,9.
- B) DHA/DPA/EPA: Stofnar (10,11,12,13,14,15,19,21,22,30),
- C) DHA/DPA/EPA/ARA: Stofnar: 16,17,18),
- D) DHA/EPA, (stofnar 23,31,32,33,34,37),
- E) DHA, (stofnar 26, 29),
- F) DPA/EPA (stofn 36),

Samanburður á flokkun (Huang o.fl. 2003) við niðurstöðurnar leiðir í ljós að:

- Flokkur B samsvarar flokki 2.
- Flokkur C samsvarar flokki 4.
- Flokkur D samsvarar flokki 3.

Flokkur A líkist flokkum 4 og 5, en munurinn liggur í að EDA greinist í A og DTA í flokki 5 greinist ekki í A. Flokkar E og F koma ekki fram í rannsóknum Huangs o.fl. (2003)

Niðurstaðan er að greining fitunnar í íslensku stofnunum flokkar stofnana í þrjá flokka af fimm eins og hjá Huang, einn íslenski flokkurinn fellur að hluta í tvo flokka Huangs og tveir flokkar íslenskir falla ekki að neinum flokki Huangs. Athyglisvert verður að sjá hvort 18s rDNA greiningin muni einnig falla að greiningu Huangs. Í íslenskum flokkum E og F er einungis einn stofn í hvorum flokki. Hér gæti verið um einstaka stofna að ræði eða stökkbreytta, en frekari rannsóknir munu leiða það í ljós.

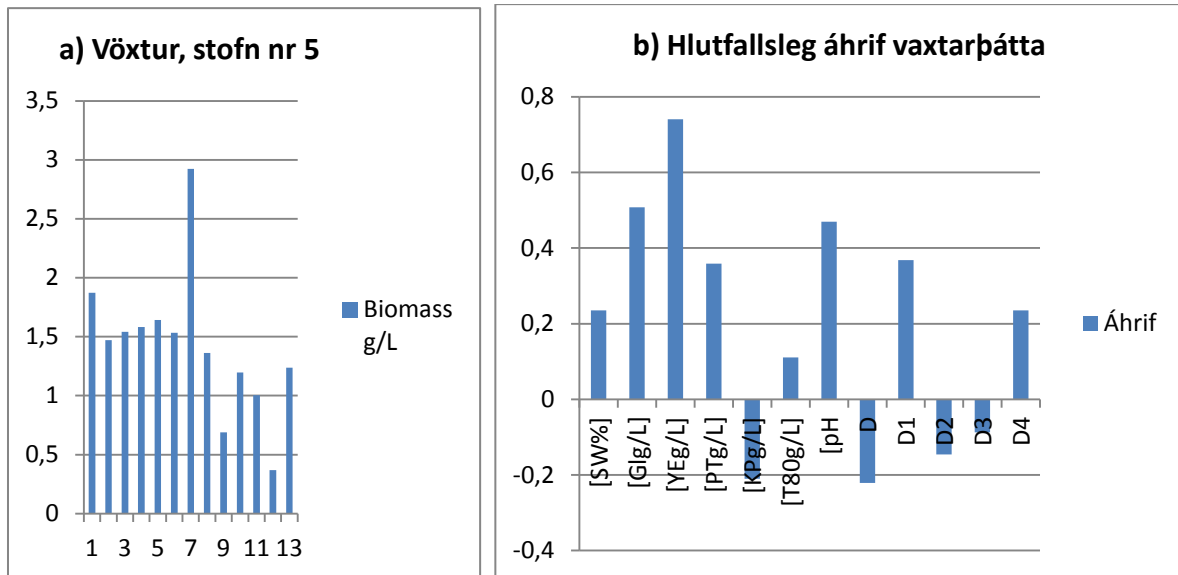
3.3 Mælingar á áhrifum næringarefna á vöxt.

Einn stofn (stofn 5) var valinn til að gera vaxtartilraunir með mismunandi næringarefnasamsetningu (vaxtarþáttum). Tafla 4 sýnir uppsetningu vaxtartilraunanna þar sem - = lágt gildi á vaxtarþætti, + = hátt gildi á vaxtarþætti og 0 = miðgildi (sjá Tafla 3).

Tafla 4. Vöxtur stofns 5 við mismunandi næringarlegar aðstæður.

Tilraunir	SW	Glu	YE	PT	KP	T80	pH	D1	D2	D3	D4	D5	Þurrvigt g/L
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	1,873
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	1,472
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	1,542
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	1,581
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	1,643
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	1,532
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	2,924
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	1,361
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	0,688
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	1,197
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	1,003
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,369
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,238

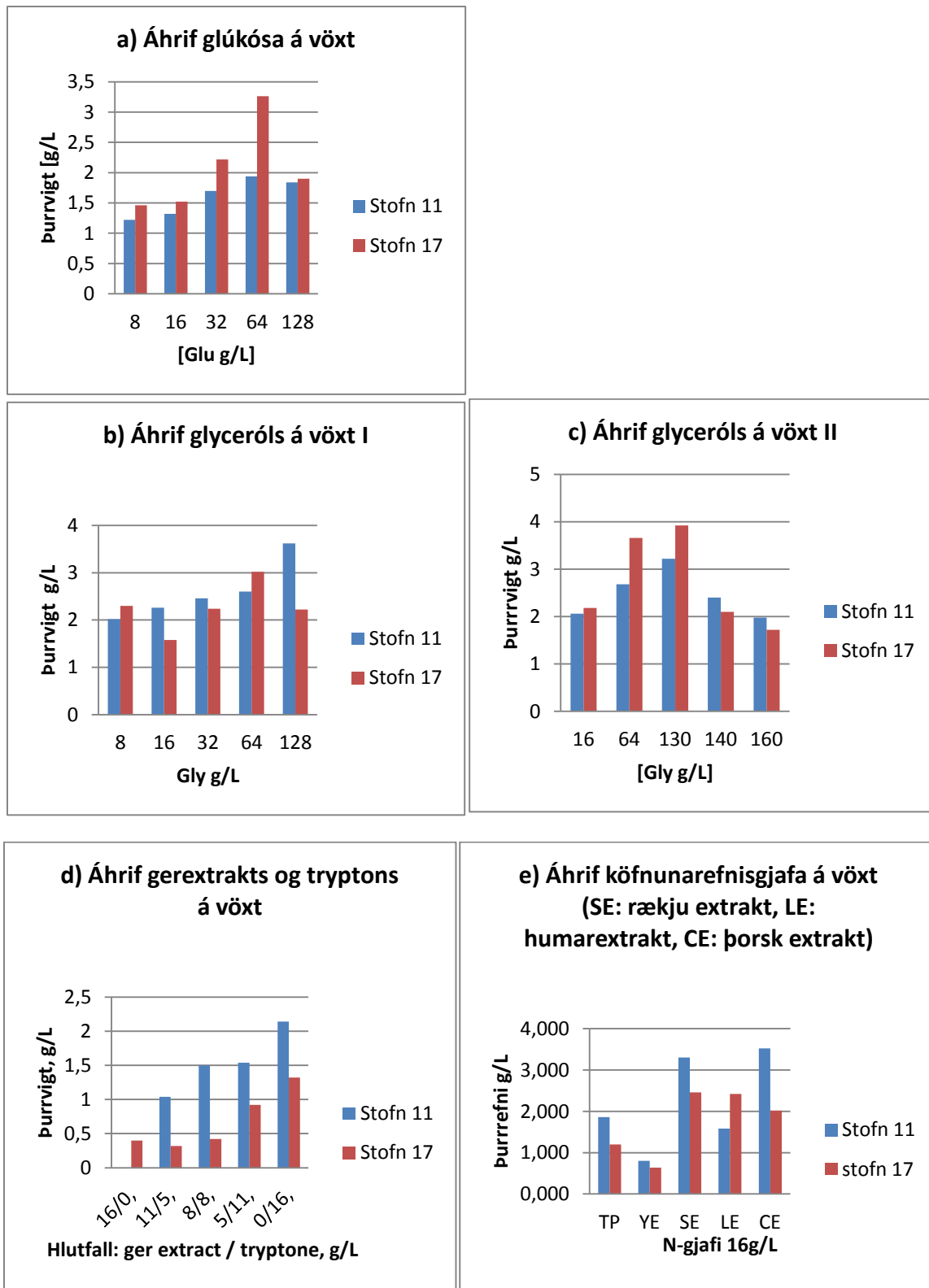
Stofn 5 óx mest í tilraun 7, þ.e. í 10% síuðum sjó, 50 g/L af glúkósa (Glu), 8 g/L af gerextrakti (YE) og 8 g/L af peptóni (PT) sbr. Mynd 7a. Jákvæðustu áhrif á vöxt höfðu glúkósi (Glu), gerextrakt (YE) og upphafs sýrustig (pH). Tween 80 hafði lítil áhrif (Mynd 7b).



Mynd 7. Vöxtur og áhrif vaxtarþátta á lífmassamyndun (Stofn 5).

Lífmassi er gefinn upp sem g þurrvigtar á lítra (vinstri) hlutfallsleg áhrif („effect“) hvers vaxtarþátta (hægri mynd).

Í framhaldinu voru athuguð áhrif valdra vaxtarþátta á lífmassaframleiðslu fjögurra Thraustochytrids stofna (1, 11, 14 og 17, einungis sýndir stofnar 11 og 17). Áhrif vaxtarþátta á myndun lífmassa þessara stofna eru sett fram á Mynd 8.



Mynd 8. Áhrif mismunandi kolefnis- eða köfnunarefnisgjafa á lífmassamyndun stofna 11 og 14.

Glyceról sem kolefnisgjafi í styrkleikanum 130 g/L gaf mesta heildarvöxt (stofn 17) eða 3,92 g þurrrefni/L (Mynd 7c).

Með glúkósa í styrkleikanum 64 g/L sem kolefnisgjafa fékkst mestur vöxtur (stofn 17), eða 3,26 g þurrefni/L (Mynd 7a). Tryptone reyndist betri köfnunarefnisgjafi en gerextrakt sbr. (Mynd 7d) en rækju- og þorsk-extrókt sem köfnunarefnisgjafar gáfu mesta lífmassann hjá báðum stofnum (Mynd 7e).

3.4 Mælingar á litarefnum

Með gleypnimælingu við 474 nm mældist heildarmagn karótenóíða í fjórum ræktunartilraunum frá 104 til 371 µg/g). Burja o.fl. (2006) mældu karótenóíða í einum *Thraustochytrid* stofni (ONC-T18) og fengu 28 µg/g. Beta-karóten greindist með HPLC en ekki tókst að greina fleiri litarefni.

3.5 Raðgreining og flokkun

Mynd 9 sýnir PCR afurðirnar sem komu fram í rafdrætti á 0.8% agarósageli.



Mynd 9. DNA magnað úr stofnum 1-9, rafdregið á 0,8% agarósageli. Fyrsta röð er DNA stigi (Fermentas) til stærðarákvörðunar, næst koma jákvætt (p) og neikvætt (n) kontrólsýni og síðan númer stofnanna.

Samanburður á niðurstöðum raðgreininga við 18s rDNA í gagnabanka NCBI leiddi í ljós að stofn 1 samsvaraði sér best við tegundina *Thraustochytrium kinnei* og stofn 12 samsvaraði sér best við *Sicyoidochytrium minutum* en báðar þessar tegundir teljast til ættarinnar Thraustochytriaceae (sjá DNA raðir í viðauka).

4 Samantekt og lokaorð

4.1 Samantekt

Í verkefninu tókst að safna 39 stofnum frá þremur sýnatökustöðum fyrir norðan land (35 lifðu til frekari rannsókna). Ætla má að þessi stofnar gefi nokkuð góða mynd af algengustu frumverum (ófrumbjarga einfrumungategundunum) hér við land, þó að æskilegast hefði verið að geta skimað eftir stofnum í kringum allt landið. Þegar aðeins þrír stofnar hafa verið raðgreindir hafa fundist tvær tegundir (*Thraustochytrium kinnei* og *Sicyoidochytrium minutum*) og er það í fyrsta sinn sem þessum tegundum er lýst með þessum hætti (raðgreiningu) á Íslandi. *Thraustochytrium* tegundum hefur áður verið lýst úr íslenskum sýnishornum. Johnson (1974) vitnar í Gartner (1968) og segir hann fyrstan til að einangra og greina þessar tegundir hér. Johnson (1974) nefnir að 7-8 tegundir *Thraustochytrium* hafi einangrast hér, aðallega frá Kollafirði. *S. minutum* hefur ekki áður verið einangruð hér svo vitað sé. Enn er verið að vinna að raðgreiningu og verður fróðlegt að sjá hvort aðrar tegundir leynast í stofnasafninu.

Báðar tegundirnar sem við höfum tegundagreint í þessari rannsókn eru af ætt *Thraustochytriaceae*. Samkvæmt Johnson (1974) var tegundinni *Thraustochytrium kinnei* fyrst lýst af Gaertner árið 1967 með smásjárskoðunum í þar til gerðu æti. Tegundinni *Sicyoidochytrium minutum* var fyrst lýst árið 2007 (Yokoyama, Salleh, Honda 2007).

Til að tegundagreina með raðgreiningu á 18S rRNA geni í stofnunum, nægir að lesa nokkur hundruð basa. Tegundagreining með raðgreiningu á DNA úr *Thraustochytrid* frumverunum hófst með grein eftir Honda o.fl. (1999). Árið 2007 birtust tvær greinar (Yokoyama og Honda 2007, Yokoyama o.fl. 2007) þar sem fimm nýjar ættkvíslir voru skilgreindar með DNA greiningu, þar á meðal ættkvíslin *Sicyoidochytrium* (stofn 12 í þessari rannsókn) sem áður hafði verið flokkuð til ættkvíslarinnar *Ulkenia*, en stofnarnir höfðu ekki aðgreinst með smásjárathugunum.

Nákvæm raðgreining á öllum 1800 bösum gensins verður framkvæmd á þeim hreinræktum sem henta í iðnaðarframleiðslu. Þegar er ljóst að íslensku stofnarnir eru frábrugðnir m.t.t. basaraðar 18S rRNA gensins í stofnum sem þegar hafa verið einangraðir. Því má leiða að því líkum að við frekari raðgreiningu mundu hinir nýeinangruðu stofnar teljast áður óþekktir stofnar af ákveðinni tegund og því mætti fá einkaleyfi á notkun þeirra sem slíkra. Nú er verið að raðgreina heildar DNA mengi tveggja *Thraustochytrid* frumvera.

Í dag eru stofnar tveggja ættkvísla notaðar við framleiðslu á sjávarolíum. Fyrirtækið Martek í Bandaríkjunum notar stofn af *Schizochytrium* ættkvíslinni og Lonza í Þýskalandi notar stofn af ættkvíslinni *Ulkenia*. Um 12 ættkvíslir tilheyra ættinni *Thraustochytriaceae*.

Nokkrum stofnum hefur verið lýst sem teljast líklegir til notkunar í iðnaðarframleiðslu vegna fituframleiðslu sinnar. Þar ber fyrst að nefna stofninn ONC 18T sem (Burja o.fl. 2006) einöngruðu en hann sýndi mestan skyldleika við tegundina *Thraustochytrium striatum*. Árið birtu (Yang o.fl. 2010) grein þar sem stofninum BL 10 var lýst og er hann álitinn tilheyra ættkvíslinni *Aurantiochytrium*. Stofninn SC1 frá Indlandi er talinn tilheyra ættkvíslinni *Schizochytrium*, en hann var einangraður árið 1990 (Jain o.fl. 2005).

Í Chile hefur einangrast *Thraustochytrid* stofn (stofn M12-X) sem tilheyrir ættkvíslinni *T. kinnei*. Þessi stofn hefur verið rannsakaður með tilliti til þess að nýta aukaafurðir frá bjór- og kartöfluverksmiðjum sem kolefnisgjafa við ræktun hans til framleiðslu á DHA og EPA fitusýrum (Quilodran o.fl. 2009).

Stöðugt birtast nýjar upplýsingar frá rannsóknarstofum um einangrun nýrra *Thraustochytrid* stofna ((Zhou o.fl. 2010, Quilodran o.fl. 2010, Rosa, Galvagno, Velez 2011) sem sýnir mikinn áhuga á þessum sjávarfrumverum. Nú hefur verið sýnt fram á að *Thraustochytrid* einfrumungar finnast við strendur landsins. Einungis tókst að einangra stofna frá 3 sýnatökustöðum af 24 og er eftirtektarvert að tveir sýnatökustaðanna eru við heita hver í sjó. Því væri sérstaklega fróðlegt að skoða fleiri svæði þar sem heitt hveravatn og kaldur sjór mætast. Einnig væri mjög áhugavert að einangra stofna frá öðrum svæðum þar sem áhrifa heits hveravatns gætir ekki. Rosa, Galvagno og Velez (2011) lýsa þeim vandamálum sem við er að etja við einangrun á *Thraustochytrid* stofnum frá köldum sjósvæðum og kemur þar fram að umhverfisaðstæður hafa mikið að segja hvort tekst að fá fram vöxt og einrækt af ákveðnum stofni. Það gæti skýrt hversu misjafnlega tókst að rækta upp stofna í þessu verkefni. Þar kemur margt til greina eins og hitastig í forrækt, magn næringarefna, saltstyrkur og vöxtur sveppa og baktería. Yfirleitt er talið að mjög lítill hluti örvera (bakteríur, sveppir, smáþörungur, frumverur) í sjó hafi verið einangraður.

4.2 Lokaorð

Í þessu verkefni tókst að einangra og greina tegundir af ættkvíslunum *Thraustochytrium* og *Sicyoidochytrium* úr sjó við Ísland (*Thraustochytrium kinnei* og *Sicyoidochytrium minutum*).

Einangrun og ræktun frumvera af ættinni *Thraustochytriaceae* frá Íslandsströndum mun koma íslenskum vísindamönnum og iðnaði til góða í nánustu framtíð við framleiðslu á sjávarolíum og öðrum lífefnum.

5 Þakkir

AVS sjóðnum er þakkað fyrir styrkveitingu til verkefnisins.

Menntamálaráðuneytinu er þakkað fyrir framlög á fjárlögum.

Erlendi Bogasyni kafara er þakkað fyrir söfnun sýna við hverastrýturnar í Eyjafirði.

Margit Eder og Sarah Werner er þökkuð vinna við raðgreiningu og ræktun á þörungunum.

Sigþóri Péturssyni og Sean M. Scully er þakkað fyrir ljósgleypnimælingar og notkun á HPLC.

6 Heimildir

Vefheimildir:

Algae- DHA [Internet]. Hong Kong: alibaba.com; c2011 [sótt 3. nóv. 2011]. Aðgengilegt á: <http://www.alibaba.com/showroom/algae-dha.html> .

Government of Canada Announces Investment to Promote Clean Technology Projects and Help Support Jobs Creation [Internet]. USA: Advanced Biofuels; c2010 [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://advancedbiofuelsusa.info/government-of-canada-announces-investment-to-promote-clean-technology-projects-and-help-support-jobs-creation> .

NCKU's Microalgal DHA Production Technology Transferred to VEDAN [Internet]. Tainan, Taiwan: National Cheng Kung University; c2009a [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://conf.ncku.edu.tw/research/news/e/20091106/2.html> .

BP and Martek Biosciences enter a joint development agreement to deliver advanced biodiesels [Internet]. USA: BP; c2009b [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://www.bp.com/genericarticle.do?categoryId=2012968&contentId=7055476> .

Technology Transfer to M/s Avestha Gengraine Technology Pvt. Ltd, Bangalore [Internet]. Dona Paula-Goa; India: National Institute of Oceanography [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: http://www.nio.org/index/option/com_newsdisplay/task/view/tid/4/sid/23/nid/240 .

Sugar to Diesel via Microbial Fermentation. Biomass 2010 Conference [Internet]: U.S. Department of Energy. Biomass Program: Biomass 2010 Conference; c2010 [sótt 3. nóv. 2011]. Aðgengilegt á: http://www1.eere.energy.gov/biomass/biomass2010/pdfs/biomass2010_track3_s1 Apt.pdf .

Canada produces strain of algae for fuel [Internet]. USA: New York Times; c2010 [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://www.nytimes.com/2010/09/30/business/energy-environment/30iht-renalg.html>.

Commercial production of DHA using heterotrophic microalgae. Microalgae Technology Conference, Taiwan [Internet]. Taiwan: Phycological Society of Chinese; c2009 [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://www.phyco.org.tw/caa/05-Commercial%20Production%20of%20DHA%20using%20heterotrophic%20microalgae%20.pdf> .

Bifuel market zeroing in on green jet fuel; SDTC projects evidence of trend [Internet]. USA: theenergycollective; c2010 [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: <http://theenergycollective.com/tyhamilton/43326/biofuel-market-zeroing-green-jet-fuel-sdte-projects-evidence-trend>.

Lonza buys Nutrinova DHA business [Internet]. United Kingdom: William Reed Business Medias; c2005 [sótt 23. nóv. 2010]. Aðgengilegt á: http://www.nutraingredients.com/Industry/Lonza-buys-Nutrinova-DHA-business?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright .

Prentaðar heimildir og einkaleyfi:

- Archibald JM. 2009. The puzzle of plastid evolution. *Current Biology* 19(2):R81-8.
- Barclay W, inventor; Process for the heterotrophic production of microbial products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids EP 1707061 (A2).
- Barclay W, inventor; Fermentation process for producing long chain omega-3 fatty acids with euryhaline microorganisms US 6451567 (B1).
- Barclay W, inventor; Food product containing thraustochytrium and/or schizochytrium microflora and an additional agricultural based ingredient. US 5908622 (A).
- Barclay W, inventor; Food product having high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. US 5340594 (A).
- Barclay W, inventor; Process for growing thraustochytrium and schizochytrium using non-chloride salts to produce a microfloral biomass having omega-3-highly unsaturated fatty acids. US 5340742 (A).
- Barclay W, inventor; 1992 July 14. Process for the heterotrophic production of microbial products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. US 5130242 (A).
- Barclay W, inventor; 1991 May 30. Process for the heterotrophic production of products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. WO 9107498 (A1).
- Barclay W and Zeller S. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and artemia nauplii by feeding spray-dried schizochytrium sp. *J World Aquacult Soc* 27(3):314-22.
- Barclay W, Weaver C, Metz J, Hansen J. 2005. Development of a docosahexaenoic acid production technology using *schizochytrium*: A historical perspective. In: Single cell oils. Cohen Z and Ratledge C, editors. 1st ed. Urbana IL, USA: AOCS Press.
- Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG, Eaton RA. 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: Screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol* 70(1-3):193-202.
- Burja AM, Girouard GS, Radianingtyas H, inventors; D4 desaturases and D5 elongases . WO 2009010825 (A2).
- Burja AM, Radianingtyas H, Barrow CJ, Windust A, inventors; Eukaryotic microorganisms for producing lipids and antioxidants . WO 2007069078 (A2).
- Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing thraustochytrium species: Screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(6):1161-9.

- Garcia AS, Parrish CC, Brown JA. 2008. Use of enriched rotifers and artemia during larviculture of atlantic cod (*gadus morhua linnaeus*, 1758): Effects on early growth, survival and lipid composition. *Aquacult Res* 39(4):406-19.
- Gould SB, Waller RR, McFadden GI. 2008. Plastid evolution RID B-8192-2011. *Annual Review of Plant Biology* 59:491-517.
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Raghukumar S, Nakagiri A, Schaumann K, Higashihara T. 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *J Eukaryot Microbiol* 46(6):637-47.
- Huang JZ, Aki T, Yokochi T, Nakahara T, Honda D, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O. 2003. Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. *Marine Biotechnology* 5(5):450-7.
- Jain R, Raghukumar S, Tharanathan R, Bhosle NB. 2005. Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. *Marine Biotechnology* 7(3):184-92.
- Johnson TW. 1974. Aquatic fungi of iceland: Biflagellate species. *Acta Naturalia Islandica* 23:1-40.
- Kanayasu-Toyoda T, Morita I, Murota S. 1996. Docosapentaenoic acid (22:5, n-3), an elongation metabolite of eicosapentaenoic acid (20:5, n-3), is a potent stimulator of endothelial cell migration on pretreatment in vitro. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54(5):319-25.
- Kimura H, Fukuba T, Naganuma T. 1999. Biomass of thraustochytrid protocists in coastal water. *Marine Ecology-Progress Series* 189:27-33.
- Kyle DJ, Reeb SE, Sicotte VJ, inventors; Docosahexaenoic acid, methods for its production and compounds containing the same. WO 9111918 (A1).
- Lian M, Huang H, Ren L, Ji X, Zhu J, Jin L. 2010. Increase of docosahexaenoic acid production by schizochytrium sp through mutagenesis and enzyme assay. *Appl Biochem Biotechnol* 162(4):935-41.
- Mariana Rosa S, Angel Galvagno M, Guillermo Velez C. 2011. Adjusting culture conditions to isolate thraustochytrids from temperate and cold environments in southern argentina. *Mycoscience* 52(4):242-52.
- Mo CQ and Rinkevich B. 2001. A simple, reliable, and fast protocol for thraustochytrid DNA extraction. *Marine Biotechnology* 3(2):100-2.
- Nagano N, Matsui S, Kuramura T, Taoka Y, Honda D, Hayashi M. 2011. The distribution of extracellular cellulase activity in marine eukaryotes, thraustochytrids. *Marine Biotechnology* 13(2):133-6.
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, et al. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources (vol 106, 15103, 2009) RID C-5128-2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(42):18040-.

- Patell VM and Rajashri KR, inventors; Docosaehaenoic acid (DHA) producing thraustochytrid strain-SC1. WO 2007068997 (A2).
- Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res* 45(1):11-36.
- Piechocki J and Torrance T, inventors; Stabilized form of fish oil. WO 2007067207 (A1).
- Plackett RL and Burman JP. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33(4):305-25.
- Quilodran B, Hinzpeter I, Quiroz A, Shene C. 2009. Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosaehaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by native thraustochytrid strains. *World J Microbiol Biotechnol* 25(12):2121-8.
- Quilodran B, Hinzpeter I, Hormazabal E, Quiroz A, Shene C. 2010. Docosaehaenoic acid (C22:6n-3, DHA) and astaxanthin production by thraustochytriidae sp AS4-A1 a native strain with high similitude to *ulkenia* sp.: Evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources. *Enzyme Microb Technol* 47(1-2):24-30.
- Raghukumar S. 2002. Ecology of the marine protists, the labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *Eur J Protistol* 38(2):127-45.
- Raghukumar S. 2008. Thraustochytrid marine protists: Production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology* 10(6):631-40.
- Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86(11):807-15.
- Tanaka S, Yaguchi T, Shimizu S, Sogo T, Fujikawa S, inventors; Process for preparing docosaehaenoic acid and docosapentaenoic acid. WO 9803671 (A1).
- Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M. 2009. Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *aurantiochytrium* sp strain mh0186. *Marine Biotechnology* 11(3):368-74.
- Yang H, Lu C, Chen S, Chen Y, Chen Y. 2010. Isolation and characterization of taiwanese heterotrophic microalgae: Screening of strains for docosaehaenoic acid (DHA) production. *Marine Biotechnology* 12(2):173-85.
- Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T, Tanaka S, inventors; Microorganisms capable of producing highly unsaturated fatty acids and process for producing highly unsaturated fatty acids by using the microorganisms. US 6582941 (B1).
- Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T, Tanaka S, Yaguchi T, inventors; Microorganisms capable of producing highly unsaturated fatty acids and process for producing highly unsaturated fatty acids by using the microorganisms. WO 9633263 (A1).
- Yokoyama R and Honda D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48(4):199-211.

- Yokoyama R, Salleh B, Honda D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. Mycoscience 48(6):329-41.
- Zhou P, Lu M, Li W, Yu L. 2010. Microbial production of docosahexaenoic acid by a low temperature-adaptive strain thraustochytriidae sp Z105: Screening and optimization. J Basic Microbiol 50(4):380-7.

7 Viðaukar.

7.1 Viðauki 1. DNA raðir úr raðgreiningu.

>S-Bald-Strain-nr-12-244-bases

```
TCGAATTTCTACGCTACATCAAACCTTTCATCCAATACAACATATCCAACG
AGTTCACCGGATCGTTCAATCTGTAGGTGCGACGGGCGGTGTGTACAAAG
GGCAGGGACGTATTCAATGCAAGCTGATGACTTGCGTTTACTAGGAATTC
CTCGTTGGAGATTAATAATTGCAAGAATCTAGCCCCATCACGACATGGAT
TCAAAAGATTACCCAATCCTTCCGGATAAGGACTTTTTCTCGT
```

>T1_SR1F_sequence-01-291-bases

```
TCTCAGTGTA AAAACTCATTGCACAGTGAAACTGCGAACGGCTCATTA
ATCGGTTCTAGTCTCCAGAGTGGTGTTCATCTAAATGGGGGATACTT
TGTGGGCAAATCTAGAAACAAATACATGCTTGGGAGGCCTGACGGGTTGT
TTTTCAACTGAAGGGGCTGGCATTATTTGATGGTGTAAAGGGACCAATAC
CCTTTCGGTGTTTGATTGGGGTGATTGCAGGAGTAACCTATGCGAACCG
CAGTGGCTCTTTGGTCGGCGGGTGACCTTTATGAGGTGTCT
```

>Sequence_T5_SR1F-05-676-bases

```
CATGCATGCTCTCAGTGTA AACTCATTGCACAGTGAAACTGCGAACGGCT
CATTAATCGGTTCTAGTCTCCAGAGTGGTGTTCATCTAAATGGATA
CTTGTGGCAAATCTAGAAACAATACATGCTTGGAGGCCTGACGGTGTTT
CACTGAAGGGCTGCATTTATTTGATGTTAGGACCAATACCTTTCGGGGTG
ATTCGGGTGATTGAGAGTAACTATGCGAACCGCAGTGGCTTTTGGTCGGC
GGTGACTTTATGAGGTTCTGCCCTATCAGGCTTTGCAACGGGTATTGTCC
TTTGCAACCGGTCACGGGTGACGGAGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGG
GAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCGGCGCGTAAATT
ACTCTATGCCAACGCGGCGAAGTACTGACGAAAAATAGGACTGGGTAGCG
CTTTGCGTTATCTTTGTCCAATGAGAGCATCTAAAGCCTCATCGAGGATC
CATTGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCGCCCCGGTAATTCCGCCTCCCAATA
GCCGTACACTAAAAGTTGTGCGTTAAAAAGCTTCTACTAATTGTATGGGA
ATCCCGCGGTGGGGTGCTTGGTGGTTTTGCCCGTAAATACCTGCTCCCCT
TTCCGCTTTTTCCGCTTTCTTAAAA
```

>Sequence_T5_SR4F-05-133-bases

```
TACACTCACATTGTTGCAGTTAAAACTCGTACTCTAATGTATGGGAGTT
GCGGGGTGGGTGCTTGGTTGGTTTTGCCGACTAGGACAATACTCGCTCCG
CTTCCCGCTTGTTCTCTCTTAAAGAAGGGAAA
```

7.2 Viðauki 2. Sýnatökustaðir.

Sýni sótt í fjöru:

1. Sandur og sjór úr vikinni á Skagaströnd.
2. Sjór og þörungar við Hrafná á Skagaströnd.
3. Sjór og þörungar við Hólmanes á Skagaströnd.
4. Sýni frá Spákonufellshöfða á Skagaströnd.
5. Sýni frá Reykjanesi við Ísafjarðardjúpi.
6. Sýni frá Grindavík.
7. Sýni frá Höfnum.
8. Sýni x3 úr Húnaflóa.
9. Sýni úr Hveravík sunnan við Drangsnes.
10. Sýni frá Hverastrytum í Eyjafirði.

Sjósýni voru sótt í Húnaflóanum:

11. Gjögur, 65°58,902 N, 21°20.71 V
12. Djúpavík, 65°57,93 N, 21°32.92 V
13. Sölvabakki, 65°42,79 N, 20°17.97 V
14. Stapi, 65°47,36 N, 20°18.63 V
15. Gjögur, 65°58,902 N, 21°20.71 V
16. Djúpavík, 65°57,93 N, 21°32.92 V
17. Stapi, 65°47,36 N, 20°18.63 V
18. Sölvabakki, 65°42,79 N, 20°17.97 V
19. Hrafná, 65°49.078 N, 20°18.636 V
20. Hallá, 65°47.211 N, 20°17.940 V
21. Stapi, Stöð 4, 65°47,36 N, 20°18.63 V
22. Sölvabakka, Stöð 3, 65°42,79 N, 20°17.97 V,
23. Á Laxárvík, 65°43.67 N, 20°16.323 V
24. Hafurstaðaá, 65°46.766 N, 20°16.765 V