

Optimalisert algeproduksjon som fôr til kamskjellyngel



Hovedfagsoppgave i akvakultur til graden

Candidatus Scientiarum

Håvard Yngve Jørgensen

Høsten 1998

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
NTNU
Botanisk Institutt



FORORD

Arbeidet med hovedoppgaven ble utført på Brattøra forskningsstasjon i perioden januar 1997 - september 1998. Kjell Inge Reitan stod for utforming av oppgaven.

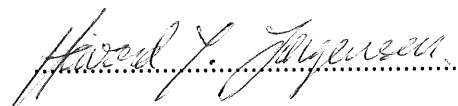
En stor takk går til Kjell Inge Reitan for faglig veiledning og imøtekommenhet. Vil også takke Helge Reinertsen for gjennomlesing av oppgaven, samt Gunvor Øie for diverse. En takk går også til Arne Næss og Sverre Myklestad for hjelp med henholdsvis CN- og karbohydratanalyse.

Takk til alle medstudenter som har gjort fritiden på Brattøra til en lang fest. Vil spesielt takke Christian Kyrre Beylich for gjennomlesing av oppgaven, Svein Mahogny Martinsen for faglig småprat og Geir K. Hansen for statistiske småtriks.

En stor takk går også til mamma og pappa fordi dere alltid viser interesse, selv når problemstillingen blir vel biologisk.

Til slutt vil jeg takke Aina for å ha gitt meg «peace of mind».

Trondheim, september 1998


Håvard Yngve Jørgensen

SAMMENDRAG

I forsøket ble følgende algearter benyttet: *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros müelleri*, *Skeletonema costatum*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (klon T-Iso), *Nannochloropsis oculata* og *Tetraselmis* sp.

Batchkultur (1 l målesylinder) ble benyttet for å karakterisere algene ved ulike temperatur og pH. Veksthastigheten (dag^{-1}) til de forskjellige artene ble bestemt, og klorofyllinnholdet hos *S. costatum*, *C. müelleri*, *I. galbana* og *Tetraselmis* sp. ble målt. Cellestørrelsen gjennom vekstfase, celleantall, pHtoleranse, karbon-, fosfat-, og nitrogeninnhold ble beregnet fra kulturer dyrket ved 20°C.

C. calcitrans, *C. müelleri*, *I. galbana* og *N. oculata* ble i tillegg dyrket semikontinuerlig i 200 l sylindere. Dyrkingen ble gjennomført ved 4%, 40% og 60% av μ_{maks} for å studere effekten av vekstbegrensning på lipid og karbohydrat innhold, samt biomasseproduksjon og stabilitet frem til kulturen skulle høstes. *C. calcitrans* ble ikke dyrket ved 4% av μ_{maks} da det oppstod problemer med ciliaten *Euplotes* sp. Alle forsøk ble gjort med kontinuerlig belysning.

I både batch- og semikontinuerligkultur var veksten begrenset av fosfor, og mikroalgenes biokjemiske respons til økt begrensning var artsavhengig.

Med unntak av *P. lutheri* og *N. oculata* viste mikroalgene stor variasjon i spesifikk veksthastighet (dag^{-1}) i området 16°C - 24°C. Det var bare *Tetraselmis* sp. og *C. müelleri* som hadde vekst ved temperaturer $\geq 27^\circ\text{C}$. Det ble også vist at kun *C. müelleri*, *N. oculata* og *Tetraselmis* sp. hadde vekst når kulturene ble innokulert ved pH 6. Ved nevnte pH var maksimal veksthastighet (dag^{-1}) lavere enn ved pH 7.5-8.5, og da spesielt for *C. müelleri*. Ved forsøk uten tilsats av ekstra CO₂ var biomassen ved vekststagnasjon opptil 3 ganger lavere enn når CO₂ ble tilført.

Hos *I. galbana* og *P. lutheri* (Haptophyceae) økte karboninnholdet per celle med tettheten på kulturen, mens nitrogeninnholdet avtok. Hos de andre artene minket både karbon og nitrogeninnholdet med økt celletetthet. Med unntak av *N. oculata* viste forholdet mellom

nitrogen og karbon en avtagende tendens ved økt celletetthet. Hos *N. oculata* økte N/C-forholdet for deretter å avta ved høyere cellekonsentrasjoner.

Artene som var >10µm hadde størst karbon:klorofyll a forhold (vekt).

Når veksthastigheten til de semikontinuerlige kulturene gikk ned økte totalt lipidinnhold hos samtlige arter. Sett under ett rommet *N. oculata* mest lipid (mg/g TV), mens *C. calcitrans* inneholdt minst. Hos *I. galbana* minket kvantitativt innhold av HUFAs ved nedgang i veksthastighet, mens det økte for de andre algeartene. Av artene som ble dyrket semikontinuerlig inneholdt *N. oculata* mest (mg/g TV) EPA (20:5ω3). Mengden av denne fettsyren var noe lavere i *C. miellieri* og *C. calcitrans* (Bacillariophyceae) og manglet nesten helt i *I. galbana*. *I. galbana* rommet desidert mest DHA (22:6ω3), mens Bacillariophyceae kun hadde små mengder, og *N. oculata* manglet denne fettsyren. AA (20:4ω6) ble funnet i samtlige arter, men i svært små mengder hos *C. calcitrans*. Bacillariophyceae inneholdt lite ω3 fettsyrer (mg/g TV).

Sett under ett inneholdt Bacillariophyceae mest karbohydrat. *N. oculata* og *C. miellieri* rommet mest karbohydrat ved 4% av μ_{maks} , men det var bare *C. miellieri* som hadde en systematisk økning fra 60% - 4% av μ_{maks} . *I. galbana* og *C. calcitrans* lagret ikke karbohydrat ved økt næringsbegrensning, og inneholdt mest karbohydrat ved 60% av μ_{maks} . β-1,3-glucan fulgte samme mønster som totalt karbohydrat. Hos *I. galbana*, *C. miellieri* og *C. calcitrans* utgjorde β-1,3-glucan mer enn 40 prosent av totalt karbohydrat uansett veksthastighet, og ved 60% av μ_{maks} utgjorde β-1,3-glucan nesten all karbohydrat i *C. calcitrans*. Hos *N. oculata* utgjorde β-1,3-glucan mindre enn 12 prosent av totalt karbohydrat

Produksjonen av karbon og lipid var størst ved 40% av μ_{maks} . Totalt produserte *C. calcitrans* mest karbon (g dag⁻¹), mens *I. galbana* produserte mest lipid. *C. calcitrans* hadde størst produksjon av karbohydrat, og av dette var mer enn 95% β-1,3-glucan.

INNHALDSFORTEGNELSE

1. INNLEDNING	1
1.1 MIKROALGER OG AKVAKULTUR	1
1.2 PRODUKSJON AV MIKROALGER	2
1.2.1 Næringsbegrensning:	3
1.2.2 Lysbegrensning:	4
1.2.3 pH og/eller karbon begrensning:	5
1.3 LIPID OG KARBOHYDRAT I MIKROALGER	6
1.3.1 Lipid:	6
1.3.2 Karbohydrat:	8
1.4. MÅL FOR OPPGAVEN	9
2. MATERIALER OG METODER	11
2.1 ORGANISMER	11
2.2 GENERELLE VEKSTBETINGELSER	11
2.2.1 f/2-medium:	12
2.3 BATCHKULTUR	14
2.3.1 Behandling av høstet algekultur:	15
2.3.2 Oppskalering:	15
2.4 SEMIKONTINUERLIGKULTUR	15
2.4.1 Behandling av høstet algekultur:	17
2.4.2 Oppskalering:	17
2.4.3 Produksjonsstabilitet og produksjon:	18
2.5 ANALYSER	18
2.5.1 Biomasseberegninger:	18
2.5.2 Telling av algeceller:	19
2.5.3 Måling av algeceller:	20
2.5.4 pH forsøk:	21
2.5.5 Karbon og nitrogen:	21
2.5.6 Fosfor:	22
2.5.7 Kvantitativ bestemmelse av klorofyll a:	23
2.5.8 Total karbohydrat:	24
2.5.9 Beta-1,3-glucan:	26
2.5.10 Lipid og fettsyrer:	27
2.6 STATISTIKK:	27
3. RESULTAT	29
3.1 BATCHKULTUR	29
3.1.1 Maksimal veksthastighet ved ulike temperaturer:	29
3.1.2 Antall celler/ml og mg karbon/l som funksjon av absorbans ved 750 nm:	30
3.1.3 pH:	30
3.1.4 Forholdet mellom nitrogen, fosfor og karbon i stasjonærfase:	31
3.1.5 Karbon og nitrogeninnhold som funksjon av algetetthet:	33
3.1.6 Forholdet mellom nitrogen og karbon (N/C) som funksjon av algetetthet:	36
3.1.7 Cellestørrelse gjennom vekstfasen:	39
3.1.8 Klorofyll a:	40
3.2 SEMIKONTINUERLIGKULTUR	41
3.2.1 Lipidinnhold:	41
3.2.2 Fettsyre- og lipidinnhold:	42
3.2.3 Forholdet mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer:	46
3.2.4 ω3 fettsyrer:	46
3.2.5 Innhold av HUFA:	48
3.2.6 Karbohydrat:	50
3.2.7 Produksjon av karbon, totallipid og totalkarbohydrat i stor kultur:	52

4. DISKUSJON	55
4.1 DYRKING AV MIKROALGER	55
4.1.1 Temperatur:	55
4.1.2 Klorofyll <i>a</i> innhold:.....	56
4.1.3 pH:	56
4.1.4 Nitrogen, fosfor og karbon:	57
4.2 VEKSTHASTIGHET OG FØRKKVALITET	59
4.2.1 Totallipid:	59
4.2.2 Fettsyrer	60
4.2.3 Karbohydrat:.....	62
4.2.4 Produksjon:.....	63
4.3 VALG AV MIKROALGER SOM FØR TIL SKJELL	63
5. KONKLUSJON OG PERSPEKTIVER	65
6. LITTERATURLISTE.....	68

1. INNLEDNING

1.1 Mikroalger og akvakultur

Mikroalger (også kalt «alger» i oppgaven) brukes som fôr i kommersiell akvakultur. Algene anvendes i tidlige stadier av produksjonen av fisk, i larvefasen av enkelte krepsdyrarter og ved oppdrett av skjellyngel (Pillay, 1990). Alger blir også brukt som fôr i produksjonen av zooplankton (rotatorier, copepoder og *Artemia*) som igjen brukes i startfôringen av krepsdyr og fiskelarver (Brown m.fl., 1989; Pillay, 1990).

Per dags dato har bruken av mikroalger i Norge først og fremst vært knyttet til oppdrett av marine fiskearter. Det er vist større overlevelse av fiskelarver ved tilsatt av alger til vannet (Reitan m.fl., 1993), og algene inngår både direkte og indirekte som fôr til yngel. Algene tas opp direkte ved at fiskeyngel aktivt forårsaker på algeceller (Reitan m.fl., 1994a; Tytler m.fl., 1997), indirekte ved at yngel forårsaker på rotatorier/*Artemia* som filtrerer alger som er tilsatt yngeldyrkingstanken (Reitan m.fl., 1993). Hypoteser som prøver å forklare økt overlevelse av fiskelarver inkluderer oppførsel (Naas m.fl., 1992), mikrobiologisk aktivitet (Nicolas m.fl., 1989) og ernæringsmessige forhold (Moffat, 1981; Reitan m.fl., 1993).

Under produksjon av kamskjellyngel (*Pecten maximus*) er det nødvendig med alger som fôr i to faser: Den første fasen er fra klekking (80 µm), gjennom larve og post-larvestadiet, til yngel (15 mm), og den andre fasen er ved kondisjonering av stamdyr. Innpumpet naturlig sjøvann kan være et alternativt fôringssystem, men problemer kan oppstå på grunn av ustabil produksjon i sjøen (Strand og Mortensen, 1995). Når yngelen har nådd en størrelse på omtrent 15 mm, settes de ut i nett eller kasser i sjøen (mellomkultur). I mellomkultur og bunnkultur vil skjell livnære seg av blant annet frittlevende mikroorganismer i vannmassene. I disse fasene vil det derfor ikke være nødvendig med kultivert fôr, og dette gjør kamskjellproduksjonen miljøvennlig (Strand og Mortensen, 1995). I 1993 og 1995 ble det produsert henholdsvis 0,2 og 1,5 millioner kamskjellyngel (15 mm) per år (Magnesen, 1996). I 1996 og 1997 økte ikke produksjonen, men stabiliserte seg rundt 1,5 millioner (Magnesen, 1998). Fra dette avsnitt vil betegnelsen yngel innbefatte alle stadier før kamskjellet settes ut i mellomkultur (15 mm).

Det høstes i dag over 1 million tonn kamskjell årlig i verden, og fisket på naturlige bestander utgjør bare en fjerdedel av denne produksjonen. På grunn av overfiske er det innført

reguleringer på høsting av naturlige bestander i de fleste fiskerier i verden, og produksjon fra fiskerier og akvakultur klarer idag ikke å dekke den store etterspørselen på markedene (Strand og Mortensen, 1995). For å imøtekomme etterspørselen har det i Norge vært gjort flere forsøk på å samle inn vill kamskjellyngel med yngelsamlere i den perioden det finnes pelagiske larver i sjøen. Men bruken av samlere har så langt ikke vært særlig vellykket, og dette har gjort det nødvendig med kunstig produksjon av yngel (Strand og Mortensen, 1995).

I naturlig miljø består føden til skjell (*Patinopecten yessoensis* Jay) av både planteplankton, detritus (dødt organisk materiale), sporer, egg, bakterier og andre mikroorganismer. Avhengig av lokalitet og årstid vil enten detritus eller planteplankton være viktigste føde (Mikulich og Tsikhon-Lukanina, 1981). For å dekke skjellyngelens komplekse ernæringsbehov bruker mange oppdrettere en blanding av to eller tre algearter ved oppdrett av skjell. Dette har vist å gi bedre vekst og overlevelse enn forsøk med en algeart (Gruffydd og Beaumont, 1972). Det benyttes mange ulike algearter ved oppdrett av skjellyngel. Noen av disse er: *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudomonas*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp. og *Nannochloropsis oculata* (Brown m.fl., 1989; Pillay, 1990).

1.2 Produksjon av mikroalger

Mikroalger dyrkes ved forskjellige metoder. Felles for produksjonsmetodene er at kulturene bobles med luft, eller en blanding av luft og CO₂, og tilsettes næringsstoffer. Næringsstoffene kan tilsettes i både organisk og uorganisk form. I utviklingsland er den organiske formen lettest tilgjengelig og brukes derfor mest (Pillay, 1990). Det finnes flere former for uorganisk næringsmedium, men i de fleste tilfeller inngår makronæringsstoffene fosfat og nitrat, og også silikat hvis det dyrkes Bacillariophyceae (Pillay, 1990). Mange produsenter bruker lite raffinerte metoder ved dyrking av alger. Dette resulterer ofte i at kulturene består av flere arter, og i varmere strøk (østen) har store utendørstanker/dammer med 8-40 tonns kapasitet blitt benyttet med stort hell (Pillay, 1990). Vannet til dammene hentes i overflaten på nærliggende vannkilder, tilsettes uorganisk eller organisk gjødsel og blir ofte boblet med trykkluft (Pillay, 1990). Mange av algeartene som brukes i akvakultur vokser raskest rundt 16-24°C, og i Norge er det derfor vanskelig å benytte utendørstanker på helårsbasis uten kunstig oppvarming (Reitan, 1997). I stedet benyttes det kunstig oppvarmet vann (200-800 l) som er

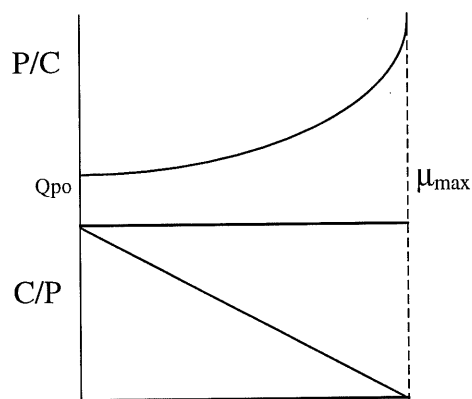
filtrert, og/eller behandlet med klor og tilsatt næringsstoffer. Vannet i algekulturen behandles og oppskaleres gradvis for å unngå oppblomstring av uønskede algearter, ciliater og bakterier (Reitan, pers. med.). I Norge dyrkes det monokulturer og det satses på enkelte kvalitetsarter hvor næringsinnholdet er forholdsvis godt kjent. Monokultur gjør det lettere å kontrollere det ernæringsmessige innholdet til fôret, men selv om hovedkomponentene i mikroalgene er kartlagt, ligger det en utfordring i å finne ut når algene skal høstes for å gi optimalt innhold av næringsstoffer og høy produksjon. Opplysninger om den enkelte arts respons til næringsstatus i algecellene (Fig. 1.1), lysbegrensning eller pH i dyrkingsmediumet (mangel på karbon) inngår som viktige faktorer for mer effektivisert produksjon av mikroalger.

1.2.1 Næringsbegrensning:

Når biomassen i en algekultur øker vil N/C og P/C per algecelle gå ned. Ved næringsmangel vil det kun være et næringsstoff som er begrensende ved et gitt tidspunkt (Droop, 1974). I tilfeller hvor det samtidig er flere næringsstoffer med suboptimal konsentrasjon, vil den begrensende næring være den som resulterer i lavest veksthastighet. Ved næringsbegrensning vil alger kunne lagre lipider og/eller karbohydrater (Siron m.fl., 1989; Sukenik og Livne, 1991; Sukenik m.fl., 1993; Brown m.fl., 1993; Reitan m.fl., 1994b; Brown m.fl., 1996). Denne responsen skyldes mest sannsynlig at algene på grunn av næringsmangel ikke er i stand til å fortsette proteinsyntesen. Dette hindrer celledelingen og fotosynteseprodukter hopper dermed opp i algecellene (Sukenik og Livne, 1991).

Det optimale N/P-forhold (vekt) er artsavhengig, og et eksempel på dette er *Skeletonema costatum* som har optimalt N/P - forhold på 3,7, sammenlignet med *Emiliana huxleyi* som har optimal N/P - forhold på 8,1 (Sakshaug m.fl., 1983). Ved gjødsling av polykulturer kan forskjellene i optimalt N/P - forhold utnyttes til å styre artssammensetningen i algesamfunnet (Reitan, 1997). Normalt vil de fleste marine arter ha et optimalt N/P-forhold på omtrent $7,1 \pm 2,6$ (Olsen og Jensen, 1989). Generelt antas det at N/C og P/C forholdet (vekt) for nitrogen- og fosformettede celler henholdsvis ligger mellom 0,163 - 0,186 og 0,016 - 0,044. N/P forhold (vekt) fra 11,76 og oppover tilsvarer P begrensning for de fleste arter (Sakshaug og Olsen, 1986).

I ferskvann er det som oftest fosfor som er begrensende faktor, mens alger som lever i havet vanligvis er begrenset av nitrogen (Haug og Myklestad, 1973). På laboratorium er begrensende faktor avhengig av hvilket medium som benyttes. Hvis det for eksempel benyttes f/2 medium (Guillard og Ryther, 1962), med N/P-forhold på 11/1 (vekt), vil veksten til de fleste marine alger mest sannsynlig være fosforbegrenset. Dette skyldes at f/2 mediumet sin N/P-sammensetning er høyere enn optimalt N/P-forhold hos de fleste alger (Reitan m.fl., 1994b). Da mange algearter kan lagre fosfor (Sakshaug m.fl., 1983), trenger ikke lavt N/P-forhold å indikere nitrogenbegrensning. Både N/P, P/C og N/C-forholdet må være kjent før en kan fastslå hvorvidt N eller P er begrensende faktor (Olsen og Jensen, 1989).



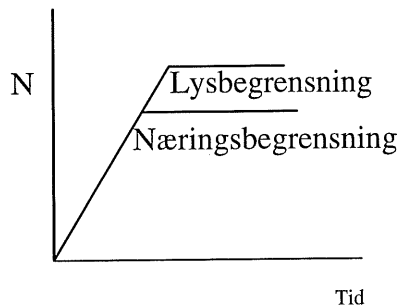
Figur 1.1: Viser veksthastigheten (μ) som funksjon av P/C- og C/P-forholdet. Q_{p0} er det minste P/C-forhold som gir vekst (Olsen, pers. med.).

1.2.2 Lysbegrensning:

Ved dyrking av alger kan en i tilfeller med lite lys (tette kulturer) få lysbegrenset vekst. Dette betyr at algene har tilstrekkelig tilgang på næringsstoffer, men for lite lys til å opprettholde veksten. Lysforhold som produserer størst mengde essensielle fettsyrer er artsspesifikke, og *Nannochloropsis* sp. har vist seg å inneholde relativt mer av fettsyren EPA (20:5 ω 3) når den dyrkes ved lysbegrensning (Sukenic og Carmeli, 1989). I kulturer med lite lys vil en finne algeceller med høyt klorofyll a og lavt karbohydrat innhold (Renaud m.fl., 1991; Brown m.fl., 1996). Innholdet av klorofyll a kan også øke med stigende temperatur (Molina m.fl., 1991; Thompson m.fl., 1992), eller være uavhengig av temperatur (Sigaud og Aidar, 1993). En mulig måte å sjekke om en har lysbegrensning er å tilsette mer næring til kulturen etter at veksten har stagnert. Hvis de andre abiotiske forholdene er tilfredsstillende, og kulturen da

ikke fortsetter å vokse er produksjonen sannsynligvis begrenset av lys (Fig. 1.2) (Harrison m.fl., 1990).

I tillegg til lysstyrken har også lysregimet betydning for biokjemisk innhold. Det er vist at *S. costatum* inneholder mer β -1,3-glucan og har større biomasseproduksjon når den er dyrket ved 12t dag/natt, enn når den vokser under kontinuerlig belysning (Vårum m.fl., 1986; Brunet m.fl., 1996).



Figur 1.2: Viser biomasse (N) som funksjon av tid ved lysbegrensning og næringsbegrensning.

1.2.3 pH og/eller karbon begrensing:

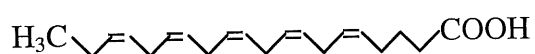
I tillegg til lys og næring kan veksten til alger også bli begrenset av høy pH eller mangel på karbon (Reitan, pers. med.). Vanlig sjøvann har pH mellom 8,0-8,5, og ved denne pH foreligger karbon i stor grad i form av HCO_3^- (bikarbonat). Da algene først og fremst tar opp karbon i form av CO_2 (Kaplan m.fl., 1986), vil likevekten i $\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{CO}_3 - \text{HCO}_3^- - \text{CO}_3^{2-}$ systemet forskyves, og det produseres OH^- . Dette gjør at pH stiger, og ved pH 9,0-10 er den vanligste karbonforbindelsen CO_3^{2-} (karbonat). CO_3^{2-} omdannes til CO_2 ved hydrolyse, og når algene tar opp CO_2 heves pH ytterligere (Kaplan m.fl., 1986). For å unngå høy pH kan algekulturen tilføres ekstra CO_2 , pulsvis eller kontinuerlig, eventuelt bobles med luft (Reitan, pers. med.).

1.3 Lipid og karbohydrat i mikroalger.

1.3.1 Lipid:

Lipider er en gruppe stoffer som har til felles at de er uløselige i vann, men løselige i ikkepolare løsningsmiddel slik som kloroform, hydrokarboner og alkoholer (Gurr og Harwood, 1991). Lipider deles inn i polare- og upolare lipider. De polare lipidene deles videre inn i fosfolipider og glykolipider, mens de viktigste upolare lipidene er triglyserider og hydrokarboner (Pohl og Zurheide, 1979). Lipidene har både en strukturell, lagrende og metabolsk funksjon. De spiller også en viktig rolle i biologiske membraner som har som oppgave å beskytte organismen mot miljøet rundt seg (Stryer, 1995). Lipidets funksjon i membranene er å hindre vann og andre molekyler i å trenge gjennom overflaten (Gurr og Harwood, 1991).

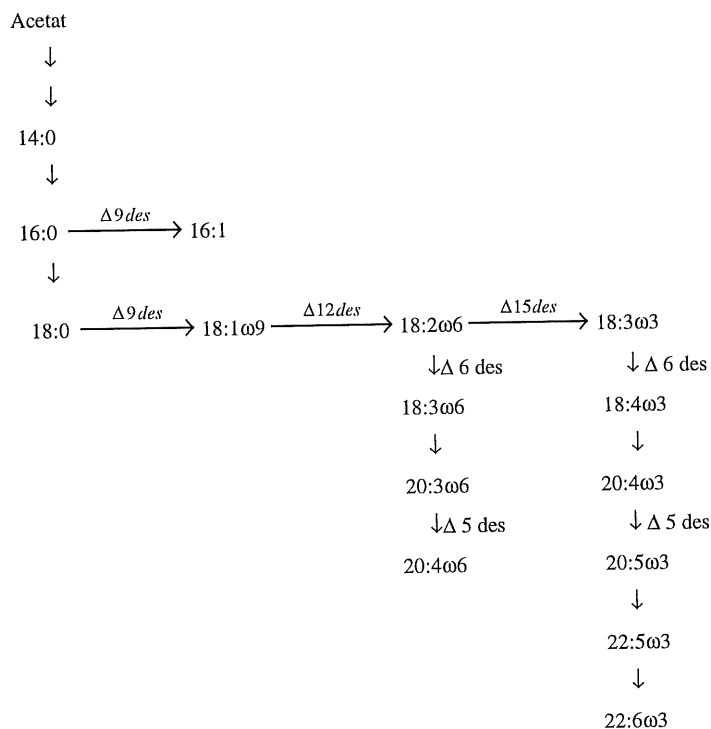
Basal enheten i mange lipider er fettsyrer (Fig. 1.3). Dette er kjeder som inneholder opptil 26 karbon atomer. PUFA (polyunsaturated fatty acids) symboliserer alle fettsyrer med mer enn en dobbeltbinding, mens HUFA (highly unsaturated fatty acids) inkluderer de fettsyrer som har 4 eller flere dobbeltbindinger, og 20 eller flere karbonatomer. Karbon-karbon dobbeltbindingene er stive og fører til at molekylene har «knekkpunkter». Med flere dobbeltbindinger får fettsyrene en irregulær form, og kan ikke krystallere på en enkel måte slik som mettede fettsyrer (Mauseth, 1995).



Figur 1.3 Viser eicosapentaenoic syre (fettsyre), også kjent som EPA. EPA har kjemisk formel $20:5\omega3$, hvor 20 står for antall karbon, 5 for antall dobbeltbindinger og $\omega3$ for at karbon nummer tre, fra metylgruppen (CH_3), har første dobbeltbinding festet til seg.

Alger syntetiserer alle fettsyrer fra grunnen (Moreno m.fl., 1979; Kayama m.fl., 1989). Enzymene som blir benyttet ved desaturering betegnes med Δx , hvor x forteller hvilket karbonatom dobbeltbindingen blir plassert etter, regnet fra karboksylsyregruppen (Stryer, 1995). Hos alger blir fettsyrer som ikke er mer umettet enn $18:1\omega9$ syntetisert i kloroplast. Fra kloroplasten transporteres $18:1\omega9$ til cytosoliske deler og inkorporeres i phosphatidylcholine (fosfolipid), hvor den videre umettingen av fettsyrene skjer (Kayama m.fl., 1989). I eksponentielt voksende kulturer av *P. tricornutum* (Bacillariophyceae), er

18:1 ω 9 rapportert å være en forløper for biosyntesen av flerumettede fettsyrer, både innen ω 3 og ω 6 familien (Moreno m.fl., 1979). 18:1 ω 9 blir desaturert til 18:2 ω 6 ved hjelp av enzymet Δ 12 desaturase, og 18:2 ω 6 blir desaturert til 18:3 ω 3 av Δ 15 desaturase (Fig. 1.4; Moreno m.fl., 1979; Gurr og Harwood, 1991). Den videre forlenging og desaturering av både 18:2 ω 6 og 18:3 ω 3 utføres av Δ 5- og Δ 6- desaturaser. Dette resulterer i biosyntesen av 20:4 ω 6 (AA), 20:5 ω 3 (EPA) og 22:6 ω 3 (DHA). Dyr har Δ 9 og Δ 6 desaturase, men mangler enzym (Δ 12 og Δ 15 desaturase) for å introdusere dobbeltbindinger til karbonatomer utenfor C9 i kjeden (fra COOH). I motsetning til alger kan dyr derfor ikke syntetisere linoleat (18:2 ω 6) og linolenat (18:3 ω 3), som er viktig for dannelsen av de langkjedete ω 6 og ω 3 fettsyrene, og disse fettsyrer må tilføres med kosten (Moreno m.fl., 1979; Stryer, 1995). Skjellyngel kan til en viss grad desaturere og forlenge 18:2 ω 6 og 18:3 ω 3, men disse reaksjonene skjer for sakte til å opprettholde vekst (Brown m.fl., 1989). For å optimalisere veksten bør derfor yngelen føres med mikroalger som inneholder PUFAene AA, EPA og DHA (Langdon og Waldock, 1981; Delaunay m.fl., 1993).



Figur 1.4: Viser mulige veier for desaturering, forlenging og forkorting av fettsyrer i marine alger (Moreno m.fl., 1979).

1.3.2 Karbohydrat:

I tillegg til lipid er karbohydrat en av hovedkomponentene i algecellene. Karbohydrater er aldehyder eller ketoner med flere hydroksylgrupper. Hos dyr og planter har karbohydrat flere hovedfunksjoner: (1) Karbohydrater finnes som energireserver, brennstoff og metabolske mellomprodukter. ATP er et fosforylert sukkerderivat, og det er også mange coenzymer. (2) Sukkerene ribose og deoxyribose inngår som en del av strukturen i henholdsvis RNA og DNA. (3) Karbohydrat er lenket til mange protein og lipider. (4) Karbohydrat inngår som strukturelle elementer i cellevegger hos bakterier og planter (Stryer, 1995).

Karbohydrater dannes via lysreaksjonen som omdanner lysenergi til kjemisk energi ved hjelp av ATP og NADPH. Calvinsyklusen, som finner sted i stroma i kloroplasten, bruker ATP og NADPH fra lysreaksjonen for å omdanne CO₂ til karbohydrat (Campell, 1993). Det direkte produktet fra «en runde» i Calvinsyklusen er ett molekyl glyceraldehydfosfat. Dette sukkeret kan inngå i glukoneogenesen i cytoplasma og danne glukose (Mauseth, 1995), eller videre i syntetiseringen av protein, lipid og andre produkter. Sukker fra Calvinsyklusen utgjør råmaterialet for all cellulær respirasjon (Campell, 1993).

Monosakkarider, disakkarider og polysakkarider utgjør totalt karbohydrat (Duffus og Duffus, 1984). Algenes polysakkarider kan videre deles inn i tre hovedgrupper avhengig av funksjon: (1) Fiberaktige glykaner, som inkluderer cellulose, chitin, mannaner, glucomannaner og xylaner. (2) Matrix, eller dekkende materialer, som tilsvare hemicellulose (binder cellulose mikrofibriller sammen) i høyere planter. (3) Polysakkarider som brukes som lager eller matreserve, her inkluderes stivelse og β -1,3-glucan (Duffus og Duffus, 1984; Myklestad, 1989; Campbell, 1993; Mauseth, 1995). Lagringsformen til algene artsavhengig (Hoek m.fl., 1995).

Ved mangel på karbohydrat kan dyr gjennom gluconeogenesen syntetisere sukker fra melkesyre, enkelte aminosyrer og glycerol (Stryer, 1995). Denne prosessen koster energi og det er derfor viktig at kosten inneholder tilstrekkelig karbohydrat. For at skjellarvene skal kunne utnytte karbohydrat må disse foreligge i en fordøybar form. Bivalver inneholder et aktivt laminarase enzym, og dette gjør dem istand til å fordøye og utnytte energi fra polysakkaridet β -1,3-glucan (chrysolamiran; Onishi m.fl., 1985). Algens innhold av β -1,3-glucan er derfor et viktig mål på lett tilgjengelige karbohydrater. Den kjemiske strukturen til

β -1,3-glucan kan beskrives som en (1,3)-lenket β -D-glucopyranan med tilfeldige forgreininger fra posisjon 2 og/eller 6. Molekylet varierer i størrelse fra 6000 til 13.000 dalton og består av glukosekomponenter (Myklestad, 1989).

1.4. Mål for oppgaven

I store deler av verden brukes marine mikroalger som fôrkilde ved kultivering av marine herbivorer. Til tross for stadige forsøk på å erstatte mikroalger med kunstig fôr, er de fortsatt en primær fôrresurs til skjell-, kreps- og fiskeyngel. Den biokjemiske sammensetningen til algen påvirkes av kultiveringsforholdene, og det er tidligere rapportert at høyt innhold av karbohydrat (β -1,3-glucan) og enkelte essensielle fettsyrer i algecellene kan ha en positiv effekt ved oppdrett av skjellyngel. Kontroll med faktorer som lys og næringstilgang (N og P) i medium, er derfor viktig for å manipulere næringsinnholdet til mikroalgene i ønsket retning. I tillegg til biokjemiske ulikheter varierer også algeartene i størrelse, og algeceller fra ulike arter vil tilføre forskjellig biomasse til yngelkarene. Kjennskap til karboninnholdet (biomassen) i algecellene er derfor viktig for å unngå overfôring og sult. I tillegg til kontroll av næringsinnholdet i algen, er stabiliteten til algekulturen av stor betydning ved produksjonen av marin yngel. Sammenbrudd i algeproduksjonen vil ødelegge grunnlaget for yngelproduksjon, og det er derfor viktig å ha kunnskap om hvilke faktorer som påvirker stabilitet og produksjon i algekulturene. Viktige parametere i denne sammenheng er pH og temperatur, og kunnskap om mikroalgenes respons på variasjon i disse abiotiske faktorer er avgjørende for effektiv produksjon av alger.

På bakgrunn av litteratur om biokjemisk innhold og dyrkbarhet, ble 7 algearter (*C. mülleri*, *C. calcitrans*, *S. costatum*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *N. oculata* og *Tetraselmis* sp.) valgt ut som potensielle fôralger for kamskjellyngel. Det ble i utgangspunktet valgt å studere artene i småkultur med hensyn på temperatur, pH, karbon, nitrogen og fosfor. Et viktig mål for oppgaven var også å kartlegge klorofyll a innhold for å undersøke hvorvidt en faktor for beregning av algebiomasse kan brukes på tvers av algeartene

Etter studiet i småkultur, ble det gjennomført en utvidet analyse av næringskomponenter i 4 (*C. mülleri*, *C. calcitrans*, *I. galbana*, og *N. oculata*) av de 7 utvalgte artene. For å oppnå de samme forhold og resultater/problemer som en eventuell oppdretter, ble denne delen av

forsøket gjort i 200 l kulturer. De 4 artene ble valgt ut av forskjellige årsaker: (1) *C. calcitrans* har gitt bra resultater som fôr-alge, men det har vært knyttet problemer til dyrkingen. For denne arten ønsket en derfor spesielt å se nærmere på ulike dyrkingsstrategier i storkultur. (2) *C. mülleri* er en forholdsvis ny art i oppdrettssammenheng, og det er derfor et generelt behov for økt kunnskap om arten. (3) *N. oculata* ble valgt da det foreligger få rapporter hvor arten er dyrket under kontinuerlig belysning, mens (4) *I. galbana* ble dyrket da biokjemisk innhold kan variere mye mellom ulike kloner (Lopez m.fl., 1992).

Algene i storkultur ble analysert med hensyn på fettsyresammensetning, totallipid og karbohydratinnhold (β -1,3-glucan) ved ulike veksthastigheter. Produksjonsutbytte (dag^{-1}) og produksjonsstabilitet frem til høsting skulle også undersøkes.

2. MATERIALER OG METODER

2.1 Organismer

I forsøket ble følgende algearter benyttet (opphav i parentes): *Chaetoceros calcitrans* (Skall pro), *Chaetoceros müelleri* (Skall pro), *Skeletonema costatum* (NIVA), *Pavlova lutheri* (Institutt for mikrobiologi, Bergen), *Isochrysis galbana* (klon T- Iso; Institutt for mikrobiologi, Bergen), *Nannochloropsis oculata* (Cambridge) og *Tetraselmis* sp. (Eget isolat) (Tab. 2.1).

Tabell 2.1: Algene som ble brukt i oppgaven (Hoek m.fl., 1995; Reitan, pers. med.).

Div/avd.	Heterokontophyta			Haptophyta (Prymnesiophyta) (Gull-brun alge)		Chlorophyta (Grønnalger)	
Klasse	Bacillariophyceae (Kiselalger/diatomeær)			Eustigmatophyceae	Haptophyceae		Prasinophyceae
Art	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Chaetoceros müelleri</i>	<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.
Størrelse (µm)	3-4	8-12	5-6	2-4	4-5	4-5	12-16
Forkortelse	C.c.	C.m.	S.c.	N.o.	P.l.	I.g.	Tetra.

Algene ble holdt i stamkulturer i Erlenmeyerkolber (250 ml) og på agarskåler. For å forlenge levetiden til stamkulturene ble de oppbevart ved omtrent 10°C i et kjøleskap med lys, og fortynnet omtrent en gang i måneden. Stamkulturene ble regelmessig kontrollert for kontaminering.

2.2 Generelle vekstbetingelser

I oppgaven ble algene dyrket både i batch- og semikontinuerligkultur. Det ble brukt 1 l målesylindere ved dyrking i batchkultur, mens 200 l sylindere ble benyttet ved semikontinuerlig dyrking. For å kontrollere pH ble kulturene boblet kontinuerlig med luft iblandet omtrent 0,2% CO₂. Forholdet mellom mengde luft og CO₂ ble holdt konstant ved hjelp av et Purge Rotameter (modell nummer 10 A 6100). Alle forsøk ble utført med konstant belysning, og alt vann som ble benyttet ble hentet fra omtrent 80 m dyp. Før bruk ble vannet filtrert gjennom 2 sandfiltere (partikkelstørrelse 0,8 - 1,2 mm og 0,6 - 0,8 mm) og et 10 µm patronfilter (WP5P10 GENUINE AMETEK PRODUCT). Kulturer som ble høstet i

stasjonærfase ble i praksis høstet når veksten var <4 prosent dag^{-1} . Dyrking av alger ble gjennomført i perioden april - september.

2.2.1 f/2-medium:

Algene ble dyrket i et næringsmedium som var basert på f/2-medium (Guillard og Ryther, 1962). f/2 medium er sjøvann pluss næringsstoffer (Tab. 2.2). For å kunne lage f/2 medium på en rask og lettvinnt måte, ble det blandet sterkt konsentrerte næringsmedium (Tab. 2.3). Konsentrert mikromineralblanding ble laget ved å løse 3,15 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ og 4,36 g NaEDTA i 900 ml ionebyttet vann. Videre ble 1 ml av hver av spormetalløsningene (Tab. 2.3) tilsatt en målekolbe og fortynnet til 100 ml. Innholdet i målekolben ble så blandet med 900 ml av $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ og NaEDTA løsningen. Den konsentrerte vitaminløsningen og makronæringsstoffene ble laget som beskrevet i tabell (2.3). Med unntak av spormetalløsningene, ble samtlige oppkonsentrerte næringsstoffer laget litervis. Alle fortynninger ble gjort med ionebyttet vann og næringsstoffene ble oppbevart på 1 l erlenmeyerkolber i kjøleskap (10°C). Totalt ble det kun laget 100 ml av hver av spormetalløsningene, disse ble oppbevart på medisinflasker i kjøleskap (10°C).

For å lage selve f/2 mediumet, ble det til 1 l sjøvann tilsatt 1 ml av hver av de oppkonsentrerte makronæringsløsningene (silikat til Bacillariophyceae), 1 ml mikromineralblanding og 0,1 ml av vitaminblandingen (Tab. 2.3). Vitaminblandingen ble alltid tilsatt etter at vannet var autoklavert og avkjølt. Vitaminløsningen som ble brukt gir et medium med omtrent 2x mer vitamin enn ordinært f/2 medium.

Tabell 2.2: Næringsinnholdet i 1 l moderert f/2-medium (Guillard og Ryther, 1962).

Næringsstoff	Kjemikalie	mg/l	Kons.(μ M)
Makronæring	NaNO ₃	75,0	883
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	5,0	36,3
	Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	15-30	54-107
Mikromineraler	NaEDTA	4,07	11,7
	FeCl ₃ *6H ₂ O	3,15	
Spormetaller	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01	0,04
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,022	0,08
	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01	0,05
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,18	0,9
	NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,006	0,003
Vitaminer	Tiamin B ₁	0,1	
	Biotin B ₄	0,0005	
	Cobalamin B ₁₂	0,0005	

Tabell 2.3: Innholdet i de oppkonsentrerte næringsblandingene som ble brukt som basis for f/2 medium.

Næringsstoff	Kjemikalie	g/dl
Makronæringsstoffer	NaNO ₃	7,5
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0,5
	Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	3,0
Mikromineraler	Se tekst	
Spormetaller	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,98
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	2,2
	CoCl ₂ *6H ₂ O	1,0
	MnCl ₂ *4H ₂ O	18,0
	NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,63
Vitaminer	Tiamin B ₁	0,2
	Biotin B ₄	0,001
	Cobalamin B ₁₂	0,001

2.3 Batchkultur

Batchkultur (1 l målesylindere) ble benyttet for å karakterisere algene ved ulike temperatur og pH. Veksthastigheten (dag^{-1}) til de forskjellige artene ble bestemt ved 16, 20, 24, 27 og 32°C, og klorofyllinnholdet hos *S. costatum*, *C. muelleri*, *I. galbana* og *Tetraselmis* sp. ble målt ved 20 og 24°C. Klorofyllinnholdet i de to sistnevnte artene ble også målt ved 27°C. Cellestørrelsen gjennom vekstfase, celleantall, pHtoleranse, karbon-, fosfat-, og nitrogeninnhold ble beregnet fra kulturer dyrket ved 20°C. Ved temperaturer over 20°C ble målesylindere plassert i 25 l akvarier (Akva-Stabil) og varmet opp ved hjelp av 3 varmekolber (VISI-THERM 75W). Kulturene hadde kontinuerlig belysning, og i luften var irradiansen $140 \mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\mu\text{Einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Det ble benyttet fire lysrør av typen Phillips TLD58W/96₅ Natural Daylight 6500, alle på samme side av kulturene. For å unngå fordampning ble åpningen på målesylindere dekket med aluminiumsfolie, og en 5 ml pipette ble brukt som «boblestein». Vannet som ble brukt i 1 l batchkulturer ble autoklavert ved 120°C i 20 minutter.

Absorbansen til batchkulturene ble målt hver dag ved 750 nm i et spektrofotometer av typen «Perkin-Elmer, Lambda 15, UV/VIS». For å beregne maksimal veksthastighet ($\mu_{\text{maks}} \text{ dag}^{-1}$), ble verdiene fra absorbansmålingene plottet på en logaritmisk skala som funksjon av tid (timer). Det ble tatt utskrift av kurvene, og intervallet med størst stigningstall ble funnet ved hjelp av linjal og øyemål (Vedlegg 14). Absorbansverdiene (N) fra dette intervallet ble brukt for å regne ut μ_{maks} (Lig.2.1; Reitan m.fl., 1989).

$$\mu_{\text{maks}} = \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) \quad (2.1)$$

hvor N_0 står for biomasse (OD_{750}) ved tid 0, t for tid (timer) og μ_{maks} for maksimal spesifikk veksthastighet (dag^{-1}).

Ligning (2.1) gav veksthastighet per time, og for å få veksthastighet per døgn ble denne verdien multiplisert med 24 t. I oppgaven er μ_{maks} et mål på den maksimale biomasseendring per døgn ved en gitt temperatur og art.

2.3.1 Behandling av høstet algekultur:

Fra batchkulturene ble det daglig tatt prøver (50 ml) fra lagfase til stasjonærfase. For at prøvene skulle gi et rett bilde av produksjonen, ble bunnslammet rørt opp med «boblestaven» før prøvene ble tatt. For analyse av batchkulturenes nitrogen-, karbon-, fosfat- og klorofyll innhold, ble en kjent mengde algekultur filtrert ned på 24 mm Whatman GF/F filter, med en porestørrelse på 0,7 µm. Filteret ble brettet to ganger og plassert i Pony vial H/I scintillasjonsglass av polyetylen. Før bruk ble scintillasjonsglass til fosfatprøver syrevasket i 10% HCl. GF/F filtrene var på forhånd glødet ved 450°C i over 2 timer for å fjerne karbonrester. Prøvene ble frosset ned ved -80°C. For telling av algeceller ble omtrent 2 ml av hver algekultur daglig fiksert med «phytofix» (Vedlegg 1). Prøvene til celletelling ble oppbevart ved romtemperatur på Pony vial H/I scintillasjonsglass av polyetylen.

2.3.2 Oppskalering:

Batchkulturene ble startet ved å tilsette 10 - 15 ml algekultur fra en stamkultur. Mengden ble justert ut fra variasjonen i tettheten til stamkulturene. Stamkulturene ble alltid sjekket for kontaminering i mikroskop før de ble benyttet. 24 timer etter start av batchkulturene lå absorbansen (OD_{750}) i kulturene mellom 0,005 og 0,01.

2.4 Semikontinuerligkultur

C. calcitrans, *C. mülleri*, *I. galbana* og *N. oculata* ble dyrket semikontinuerlig ved 20°C i 200 l polyetylen sylindere med radius på 40 cm. Dyrkingen ble gjennomført ved ulike veksthastigheter (fortynningsgrader) for å studere effekten av vekstbegrensning på lipid og karbohydrat innhold, samt biomasseproduksjon og stabilitet frem til kulturen skulle høstes. Før høsting ble artene dyrket semikontinuerlig i minimum to dager etter at absorbansen/biomassen hadde stabilisert seg. Absorbansen ble målt hver dag før fortynning av algekulturen, og kulturene ble daglig kontrollert i mikroskop for kontaminering. Hver tank ble kontinuerlig belyst med fire lysrør av typen Phillips TLD58W/96₅ Natural Daylight 6500, to på hver side. Irradiansen ble målt 10 cm under overflaten, midt i vannsøylen og 30 cm over utløpet. Gjennomsnittet av disse målinger var 22 µmol fotoner m⁻²s⁻¹. Kulturene ble boblet med omtrent 9 l luftblanding i minuttet.

Mengden daglig fortytning (ΔV) ble beregnet slik at veksthastigheten dag⁻¹ (μ) før høsting stabiliserte seg på 4%, 40% eller 60% av μ_{maks} . Størrelsen på μ ved de ulike fortytningsgradene ble bestemt ut fra ligning (2.2).

$$\mu = n * \mu_{\text{maks}} \quad (2.2)$$

hvor n vil være lik 0,4 hvis en ønsker å finne størrelsen på μ ved en fortytning som tilsvarer 40% av μ_{maks} (μ_{maks} er tidligere beregnet i 1 l batchkulturer).

Etter å ha bestemt μ ble tiden (t) mellom hver fortytning (Fig. 2.6) satt lik 1, så både μ og t var kjente verdier. Det totale volum ($V_{\text{tot.}}$) var også kjent (200 l), og dermed kunne V_0 bestemmes (Fig. 2.6). ΔV ble bestemt ut fra ligning (2.5). Ligning (2.6) ble utledet ved å kombinere ligning (2.3) med (2.5). Ligning (2.3-2.5) og (2.7) er hentet fra Reitan m.fl. (1989).

$$\mu = \frac{\ln(\frac{\Delta V}{V_0} + 1)}{t} \quad \text{eller} \quad \Delta V = V_0 (e^{\mu t} - 1) \quad (2.3)(2.4)$$

ΔV er det volum som tappes ut og erstattes hver dag, V_0 er volum etter fortytning, før nytt medium er tilsatt, μ er spesifikk veksthastighet og t er tiden i døgn.

Sammenhengen mellom $V_{\text{tot.}}$, ΔV og V_0 vises av ligning (2.5):

$$V_{\text{tot.}} = \Delta V + V_0 \quad (2.5)$$

hvor $V_{\text{tot.}}$ er det totale volum til kulturen.

$$V_0 \text{ kan også uttrykkes :} \quad V_0 = \frac{V_{\text{tot.}}}{\exp.(\mu t)} \quad (2.6)$$

hvor $\exp.(\mu t)$ er lik $e^{\mu t}$.

Daglig produksjonsutbyttet ble beregnet ved hjelp av ligning (2.7):

$$P = N V \quad (2.7)$$

hvor N er biomasse (tørrvekt/l, karbon/l, lipid/l eller karbohydrat/l) og V er daglig høstet volum.

Vannet til de semikontinuerlige kulturene (200 l) ble klorert med 10% natriumhypokloritt (NaClO) i forholdet 25 ml hypokloritt per 100 l vann. Kloret fikk virke i omtrent 24 t før avkloring. Til avkloring ble det brukt natriumtiosulfat (Na₂S₂O₃), 3 gram per 100 l vann. Natriumtiosulfaten ble tilsatt vannet og fikk løse seg opp i 5 minutter. Før start av forsøk ble kulturen kraftig boblet med luft i 5-10 minutter. For å overføre ferdigkloret/avkloret vann til dyrkingstankene, ble det benyttet en drillpumpe av typen Piranha super (Piranha von B.B.W., D-94124 Büchlberg, Passau Germany). Det ble ikke tilsatt næringsstoffer direkte til tanken hvor behandlingen av vannet ble gjort. Dette for å hindre unødvendig oppblomstring av bakterier og alger i vannbehandlingstanken. Næringsstoffer ble istedet tilført dyrkingstankene etter at nytt vann var pumpet over.

2.4.1 Behandling av høstet algekultur:

For analyser av lipid, fettsyre, β -1,3-glucan og totalt karbohydrat ble algebiomasse fra de store kulturene sentrifugert ned (omtrent 3-4 gram våtvekt per kultur). Med unntak av *N. oculata* ble samtlige av algekulturene sentrifugert ved 3000 rpm i 15 minutter (Wifug 4000 E). *N. oculata* ble på grunn av liten størrelse sentrifugert ved 5000 rpm i 15 minutter (Heraeus Cryofuge 8000). Algebiomassen ble frosset ned i nitrogenatmosfære ved -80°C, og senere frysetørket før analysene ble gjennomført. Den frysetørkede biomassen ble også oppbevart i nitrogenatmosfære ved -80°C.

2.4.2 Oppskalering:

Oppskalering til 200 l ble startet ved å dyrke en ti-liters algekultur i autoklavert f/2 medium. Når absorbansen ved 750 nm var over 0,4, ble ti-literen helt over i 90 l ferdigkloret/avkloret

f/2 medium. 100 literen med alger fikk stå i omtrent 24 timer før de resterende 100 l klore/avklore sjøvann ble pumpet over, deretter ble næringsstoffer tilsatt.

2.4.3 Produksjonsstabilitet og produksjon:

Artens evne til å unngå kontaminering fra andre algearter, sopp, cyanobakterier, bakterier og ciliater ble brukt som mål på produksjonsstabilitet. Kulturene ble fulgt gjennom inkuberingsperioden og frem til biomassen hadde stabilisert seg. For å undersøke nødvendigheten av vannbehandling, ble *C. calcitrans* også forsøkt dyrket uten å klore/avklore dyrkingsmediumet. Vekstforholdene var ellers som beskrevet i avsnitt (2.4).

Absorbansen til kulturene ble målt hver dag før høsting (Vedlegg 12). Produksjonen av karbon i semikontinuerligkultur ble beregnet ved hjelp av ligningene i tabell (3.1) og tabell (3.4). Produksjonen av totallipid og totalt karbohydrat ble beregnet ut fra produksjonen av karbon og antakelsen om at:

$$TS = 2,62 * \text{karbon} \quad (2.8)$$

hvor TS er tørrstoff (frysetørket) og 2,62 er beregnet ut fra forholdet mellom TS og karbon i *I. galbana* (Vedlegg 13). Data for beregning av 2,62 ble hentet fra hovedfagsoppgaven til Kjell Inge Reitan (1988). Mengden av totalt karbohydrat og totallipid er kjent som mg/g TV algebiomasse, og ut fra dette kan produksjonen beregnes.

2.5 Analyser

2.5.1 Biomasseberegninger:

Absorbansen til batchkulturene ble målt hver dag ved 750 nm i et spektrofotometer. Det ble benyttet en kyvette med 1 cm lysvei, og spektrofotometeret ble nullstilt med springvann. Antall timer mellom hver observasjon ble notert. Det ble brukt to metoder for å måle biomasse (N): I metode (1) ble celletall telt hver dag i Bürkers tellekammer (Avsnitt 2.5.2). Celletallene ble deretter plottet mot absorbansen til kulturen for den enkelte dag, og ut fra dette ble det laget regresjonslinjer. Ligningen for regresjonslinjen gav antall celler som en funksjon av absorbansen ved 750 nm (Tab. 3.1). I metode (2) ble et bestemt volum algekultur

filtrert ned på et glødet GF/F filter (0,7 μm) og analysert for karbon (Avsnitt 2.5.5). Deretter ble mg karbon/l plottet som funksjon av absorbans ved 750 nm. Regresjonsligningene fra plottene er gjengitt i tabell (3.1).

2.5.2 Telling av algeceller:

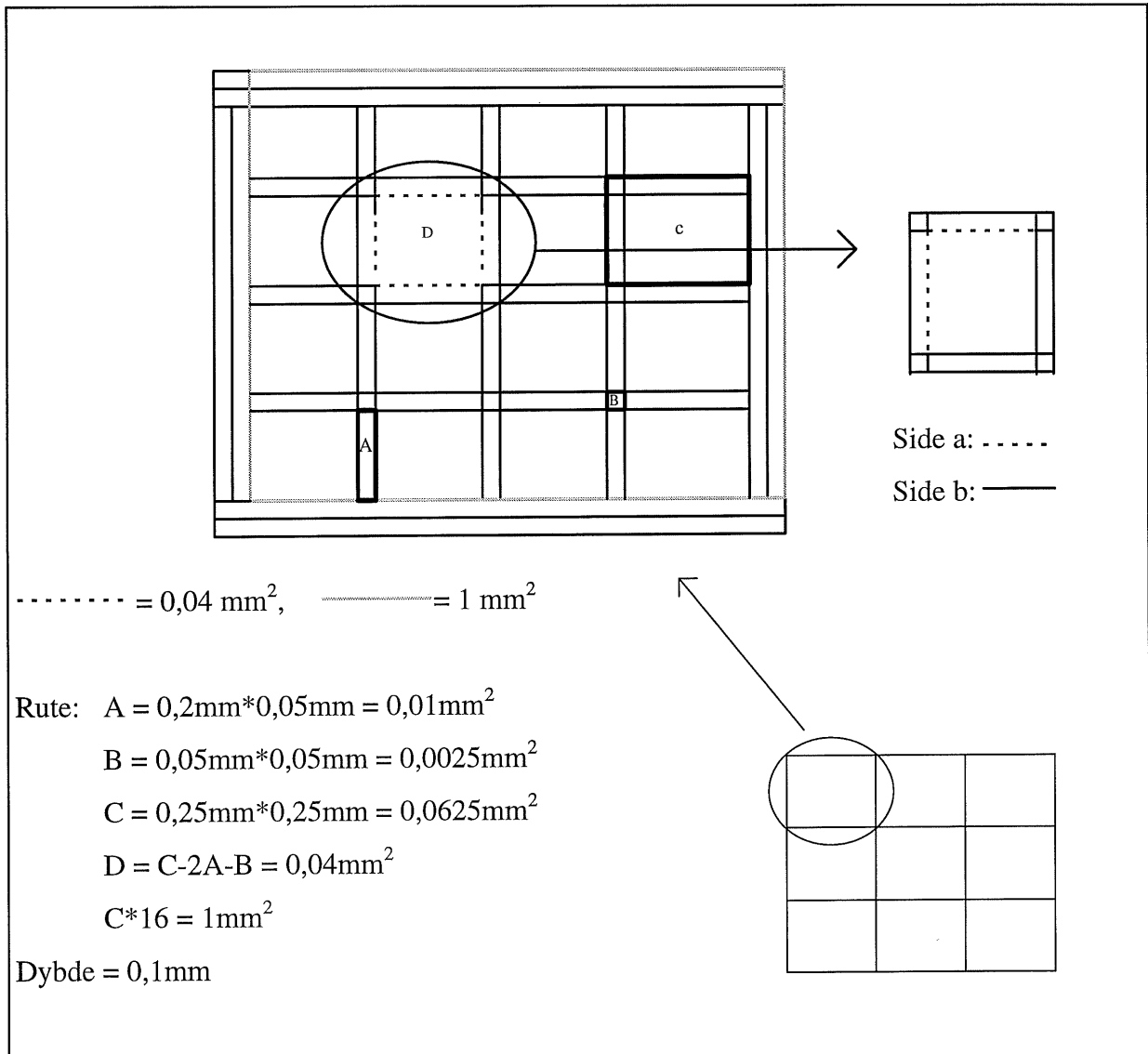
For telling av algeceller ble Bürkers tellekammer benyttet. Dekkglass ble lagt over tellekammeret og algeprøven ble tilført ved hjelp av en pipette. Algene ble telt i lysmikroskop ved 100X forstørrelse. For å få rimelig nøyaktighet, ble det telt omtrent hundre algeceller per prøve. Avhengig av tettheten på algekulturen, kan en benytte seg av de store eller små rutene i tellekammeret (Fig. 2.1). I oppgaven ble 0,04 mm^2 rutene benyttet (rute D). Prøvene ble fortynnet med ionebyttet vann når tettheten ble så stor at telling i rute D ble vanskelig. Dybden på Bürkner kammeret er 0,1 mm. Volumet (V) for stiplede område (Fig. 2.1) er:

$$V = 0,1 * 0,04 = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,004 \mu\text{l} \quad (2.9)$$

En kan altså telle algecellene i en stiplede rute (Fig. 2.1) for å estimere hvor mange mikroalger som finnes i 0,004 μl . For at alge/volum forholdet skal bli så korrekt som mulig teller en de algecellene som er i kontakt med side a, og utelukke algene som er i kontakt med side b (Fig. 2.1). For å øke nøyaktigheten i metoden ble det telt minst ti 0,004 mm^3 volum og gjennomsnittet av disse ble beregnet. Ligning (2.10) viser omregning til algeceller/ml.

$$\text{Antall algeceller/ml.} = \left(\frac{\text{Snitt}}{0,004 \text{ mm}^3} \right) * 1000 \quad (2.10)$$

hvor snitt er lik gjennomsnittet av de telte 0,004 mm^3 volum.



Figur 2.1: Størrelsen til de ulike rutene i Bürkner kammeret som ble benyttet ved telling av algeceller. Et Bürkner tellekammer inneholder 2 rutekompleks (9 ruter) av typen som er nederst til høyre på figuren.

2.5.3 Måling av algeceller:

Tetraselmis sp. og *C. müelleri* ble dyrket i 1 l batchkulturer for å undersøke cellestørrelse gjennom vekstfasen. Det ble daglig tatt prøver og målt absorbans (OD_{750}) av begge kulturrene. 100 μl av algeprøven ble plassert på et objektglass, og fikk stå i omtrent 20 minutter. Dette ble gjort for at *Tetraselmis* sp. skulle ligge rolig. Selve målingen av cellestørrelse ble gjort ved hjelp av et rutenett i et mikroskop av typen «Leitz». Ved 400x forstørrelse var avstanden mellom enhetene i rutenettet 2,05 μm . Det ble målt 15 algeceller per dag og gjennomsnittet av disse ble beregnet. Størrelsen til *C. müelleri* ble beregnet som den største lengden av de

synlige sidene. Volumet til *Tetraselmis* sp. ble beregnet ut fra en forenklet antakelsen om at algen var sylinderformet.

2.5.4 pH forsøk:

For å undersøke effekten på vekst ved høy og lav pH i vekstmediumet, ble kulturen henholdsvis tilført luft uten ekstra CO₂ og med mye CO₂. pH ble målt med et «744 pH Meter, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland». For å måle algenes overlevelse ved lav pH, ble kulturmediumet tilsatt mye CO₂ slik at pH stabiliserte seg på omtrent 6, deretter ble algene tilført. Artenes evne til å vokse ble registrert, og algekulturer som ikke viste vekst etter 5 døgn ble avsluttet. De artene som overlevde pH 6 fikk vokse til stasjonærfase, og maksimal veksthastighet og biomasse ved vekststagnasjon ble beregnet. For å registrere algenes evne til å overleve ved høy pH ble kulturene boblet med ren luft uten ekstra tilførsel av CO₂. Da biomassen i algekulturen økte steg pH (Avsnitt 1.2.3). Artenes evne til å tåle høy pH ble beregnet ut fra den pH som kulturen hadde i stasjonærfase.

2.5.5 Karbon og nitrogen:

Et kjent volum algekultur ble filtrert ned på glødet 24 mm Whatman GF/F filter. Filtrene med algebiomasse ble klippet til slik at kun den delen som inneholdt alger ble igjen. Denne delen ble delt i to og pakket i tinnbåter med dimensjon 4/6 mm, og volum på 0,07 ml. Pakkingen ble gjort med pinsett, og filteroppsats, saks og pinsett ble vasket i aceton før bruk. Tinnbåtene med filter ble plassert i tørkeskap ved 60°C i 48 timer og deretter bearbeidet til små kuler. Aluminiumsfolie ble benyttet som underlag ved pakkingen. Under selve analysen blir tinnbåtene forbrent ved 1061°C i et kvartsrør. Ved denne temperaturen vil alt nitrogen bli omdannet til nitrogenoksid, mens karbonet omdannes til karbondioksid. Videre blir forbrenningsgassene ledet over kopper ved 650°C, dette reduserer nitrogenoksidet til nitrogen. Nitrogen og karbondioksid blir så separert med en kromatografisk kolonne og detektert ved hjelp av en varmetråddetektor, (TCD). Kvantifiseringen skjedde ved hjelp av ekstern standard metode, og acetanilid (C₈H₉NO) ble brukt som standard i analysen.

Karbon utgjør 71,09% og nitrogen 10,36% av tørrvekten til acetanilid. For å lage standardkurver ble arealutslaget på analysatoren plottet som funksjon av mengde karbon og nitrogen. For å finne den reelle mengden karbon og nitrogen ble acetanilid, som var veid inn som standard, multiplisert med henholdsvis 0,7109 og 0,1036. Hver analysedag ble det laget ny standardkurve med minst 7 acetanilidstandarer mellom 80 og 700 µg. Prøvene ble fordelt utover analyseperioden. Halve rene filter ble kjørt som nullprøver. Verdiene av disse ble trukket fra karbonarealet til samtlige prøver (Vedlegg 15). Analyse av «tomme hull», gav ikke noe utslag i nitrogen eller karbon området. Analysene ble gjort på en CARLO-ERBA NA 1500 CHN + O/S analysator. Det ble kjørt 2-3 paralleller.

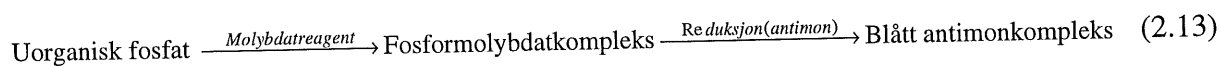
Eksempler på ligninger for omregning fra areal (Y) til µg N (Lig. 2.11) og µg C (Lig. 2.12)

$$Y_N = 668.63X + 2561.5 \quad (2.11)$$

$$Y_C = 2231.4X - 18111 \quad (2.12)$$

2.5.6 Fosfor:

Fosfor ble analysert etter en modifisert metode utarbeidet av Koroleff (1976). For å løse organisk knyttede fosforfraksjoner, ble filtrene med algebiomasse autoklavert i en halv time. Mengden frigjort PO_4^{3-} ble deretter målt ved hjelp av en reaksjon av ionene med en sur molybdat reagent. Dette gav et fosformolybdatkompleks som deretter ble redusert til et farget blått stoff. Reduksjonen skjer med antimonioner. Antimonioner reagerer hurtig med fosfationer og gir et blått kompleks som inneholder antimon i et 1:1 forhold (atomer) til fosfor (Lig. 2.13). Det ble kjørt 3 paralleller.



Et kjent volum algekultur ble filtrert ned på glødet 24 mm Whatman GF/F filter. Utstyret var syrevasket i HCl (10%) for å fjerne eventuelle fosfatrester. Filtrene ble overført til 100 ml polypropylen flasker med skrukork (Kartell), tilsatt 50 ml ionebyttet vann, og deretter 4 ml av en kalium persulfatløsning (Vedlegg 2). Flasken ble lukket og plassert i autoklaven ved 110°C i 30 minutter. Beholderne ble så tatt ut, og fikk kjøle seg ned til romtemperatur. Innholdet ble filtrert (24 mm Whatman GF/F filter) før det ble overført til nye rene flasker. Tilsatte så 1 ml

askorbinsyremiks (ristet). Ventet i et halvt minutt og tilsatte 1 ml av mikset reagens (ristet). Etter ytterlige 5 minutter ble absorbansen målt ved 880 nm.

For å beregne mengden fosfor i prøven (Lig. 2.16) måtte en faktor F bestemmes (Lig. 2.14). F varierer ved bruk av ulike forsøksoppsett, og i gjeldende forsøk fikk F verdien 5,092.

$$F = 1/(OD_{880\text{standard}} - OD_{880\text{blank}}) * 9,82 \quad (2.14)$$

hvor $OD_{880\text{standard}}$ er gjennomsnittlig absorbans fra en standard som inneholdt 1,0 μmol fosfat l^{-1} (Vedlegg 2) og $OD_{880\text{blank}}$ er gjennomsnittlig absorbans av blank prøve. Da ligningen er konstruert for 10 cm kyvette måtte absorbansmålingene fra 1 cm kyvette korrigeres med en faktor på 9,82 (Dahle, 1994). Det ble kjørt tre paralleller.

Mengde fosfat ($\mu\text{mol/l}$) regnes ut fra formel (2.15):

$$\mu\text{mol P/l} = F(OD_{880\text{prøve}} - OD_{880\text{blank}}) \quad (2.15)$$

Hvor $OD_{880\text{prøve}}$ er gjennomsnittlig absorbans av prøvene og $OD_{880\text{blank}}$ er gjennomsnittlig absorbans av blank prøve med rent filter.

Total mengde (μg) fosfor i prøven ble beregnet ut fra ligning (2.16).

$$\text{Total mengde } (\mu\text{g}) \text{ fosfor i prøven} = ((OD_{\text{prøve}} - OD_{\text{blank}}) * 5,092) \text{mikromol/l} * 30,97 \text{g/mol} * 0,05 \text{l} \quad (2.16)$$

2.5.7 Kvantitativ bestemmelse av klorofyll a:

Analyse av klorofyll a ble utført for å kunne beregne klorofyll a per celle ved ulike temperaturer og i forhold til karboninnhold. Det ble benyttet en modifisert metode, hvor hovedtrekkene tidligere er beskrevet av Parsons m.fl. (1984). Prøvene ble tatt fra 1 l batchkulturer i stasjonærfase.

En kjent mengde algekultur ble filtrert ned på glødet 24 mm Whatman GF/F filter. Filteret med algebiomasse ble deretter benyttet til kvantitativ bestemmelse av klorofyll a. I selve analysen ble GF/F-filteret lagt i 4,5 ml kald (isbad 0°C) aceton (100%) som var nitrogenboblet i 60 minutter. Prøven ble ekstrahert mørkt i kjøleskap (4°C) i 24 timer. Deretter ble det tilsatt 0,5 ml destillert vann for å fortynne prøven til 90% aceton. Til slutt ble prøven refiltrert gjennom GF/F filter, og den optiske tettheten til ekstraktet ble målt spektrofotometrisk ved 630, 647 og 664 nm i en 1 cm kyvette. Referansen var 90% aceton og spektrofotometeret ble nullstilt for hver bølgelengde.

Konsentrasjonen av klorofyll a (C_a) ble bestemt etter ligning (2.17) og (2.18).

$$C_a = 11,85 \times OD_{664} - 1,54 \times OD_{647} - 0,08 \times OD_{630} \quad (2.17)$$

hvor OD_x er optisk tetthet ved bølgelengde x.

Korrigeringsfaktor for filtrert volum og ekstraheringsvolum ble gjort ved hjelp av ligning (2.18)

$$\mu\text{g Chl a L}^{-1} = \text{mg Chl a m}^{-3} = \frac{C_a \times V_{\text{aceton}}}{V_{\text{kultur}} \times l} \quad (2.18)$$

hvor V_{aceton} er ekstraheringsvolum i ml (i dette tilfelle 5 ml), V_{kultur} er volum filtrert kultur i liter og l er kyvettebredde, det vil si lysvei i cm (i dette tilfelle 1 cm).

2.5.8 Total karbohydrat:

Total karbohydrat mengde ble bestemt ved hjelp av en fenol-svovelsyre metode (Dubois m.fl., 1956). Metoden er basert på en hydrolyse av polysakkarider og dehydrering av monosakkarider for å danne furfuraler fra pentoser og hydroksymetylfurfuraler fra heksoser. Konsentrert H_2SO_4 blir benyttet for hydrolyse og dehydrering. Løsningen av furfuraler og hydroksymetylfurfuraler behandles deretter med en reagent (phenol) for å produsere en farget løsning i form av kromogener. Fargen er stabil i flere timer.

Metoden måler ikke alle sukkerarter i algecellene like nøyaktig. Dette skyldes at karbohydrat-gruppene har ulike bølgelengder hvor absorpsjonen er maksimal, og forskjellig evne til å danne kromogener. Pentoser og uronsyre har et absorbansmaksimum ved 480 nm. Heksoser og deres metylerte derivater har absorpsjonsmaksimum ved 485-490 nm, mens trioser og tetrosler ikke gir kromogener i det hele tatt. Da målingene i metoden ble gjort ved 488 nm, og standardkurven ble laget med glukose (Vedlegg 3), medfører dette en mulig underestimering av sakkarider med kjemiske egenskaper som avviker fra glukose. Metoden ble likevel valgt da den gir et bra estimat på total karbohydrat i celler som inneholder 10% eller mer heksose polymerer (Gerhardt m.fl., 1994).

2-3 mg frysetørket prøvemateriale ble overført til tykkveggede Pyrex prøverør. Volumet ble justert til 1 ml med ionebyttet vann og ristet. Prøven ble deretter tilsatt 1 ml av en fenol reagent (Vedlegg 3) og ristet. Til slutt ble det tilsatt 5 ml konsentrert svovelsyre (95-97%) under kontinuerlig omrøring. Etter tilsats av svovelsyre, fikk prøvene stå 10 minutter ved romtemperatur, og ble så overført til vannbad (25°C) i 15 minutter. Det ble tatt hensyn til eventuell «bakgrunnsstøy» i forsøket ved å kjøre blanke prøver (1 ml ionebyttet vann, 1 ml phenol og 5 ml konsentrert svovelsyre) og trekke absorbansverdiene til disse fra prøveabsorbansen (Lig. 2.20). Absorbansen ble målt ved 488 nm og konsentrasjonen av glukose ble bestemt ved hjelp av en standardligning (Lig. 2.19 og 2.20). Standardkurven ble laget ved å plote absorbans ved 488 nm som funksjon av en kjent glukose konsentrasjon. For å få nøyaktige absorbansmålinger, ble prøvene fortynnet slik at absorbans verdiene lå under 1 (Myklestad, pers. med.). Prøvene ble fortynnet med ionebyttet vann, før phenol og svovelsyre ble tilsatt. Det frysetørkede prøvematerialet ble veid på en «Precisa, 180 A», med minste måleenhet på 0,1 mg. Det ble kjørt 2 paralleller.

Standardkurve for glukose gav regresjonsligningen:

$$y = 0,0102x + 0,0721 \quad (2.19)$$

hvor y er absorbans ved 488 nm og x er µg glukose per ml.

For å regne ut den reelle konsentrasjonen av glukose i prøven, ble målingene korrigert med en blank prøve (Lig. 2.20).

$$\mu\text{g glukose i prøven} = \frac{((OD_{prøve} - OD_{blank}) - 0,0721)}{0,0102} * n \quad (2.20)$$

Ligning (2.19) gir μg glukose per ml. Derfor må brøken i ligning (2.20) multipliseres med n ml for å beregne hvor mye glukose som totalt finnes i prøven. I de fleste tilfellene var $n = 7$ ml (1 ml ionebyttet vann, 1 ml phenol og 5 ml konsentrert svovelsyre). Ved fortynning av prøven måtte n korrigeres.

2.5.9 Beta-1,3-glucan:

Kvantitativ bestemmelse av β -1,3-glucan ble gjort ut fra en metode beskrevet av Myklestad og Haug (1972). Metoden er basert på at ekstrahering av frysetørket materiale med 0,1N svovelsyre (Vedlegg 3) fjerner et polysakkarid som hovedsakelig består av glukoseenheter.

Frysetørket prøvemateriale (10-20 mg) ble ekstrahert to ganger med 10 ml 0,1N svovelsyre i tykkveggede Pyrex prøverør. Ekstraheringen ble gjort ved å blande (riste) syren med det frysetørkede materialet. Hver ekstrahering foregikk i to timer. Mellom ekstraheringene ble prøvene filtrert (24 mm Whatman GF/F-filter). Filtratet og filteret fra den første filtreringen ble tatt vare på, og filteret med algebiomassen ble ekstrahert på nytt (andre ekstraksjon). Etter 2 timer ble også denne prøven filtrert, og de to filtratene ble blandet til slutt; totalt 20 ml. Poenget med to ekstraheringer var å få en mest mulig fullstendig ekstraksjon. Til slutt ble 1 ml av ekstratet analysert i total karbohydrat metode (fenolmetode; Dubois m.fl., 1956). Absorbansresultatene fra denne analysen ble satt inn i ligning (2.21), og total mengde β -1,3-glucan i prøven ble regnet ut. Det ble kjørt 2 paralleller.

$$\mu\text{g } \beta\text{-1,3-glucan i prøven} = \frac{((OD_{prøve} - OD_{blank}) - 0,0721)}{0,0102} * 20 \quad (2.21)$$

For å beregne hvor mye β -1,3-glucan som det totalt var i ekstratet ble brøken i ligning (2.21) multiplisert med 20 ml.

2.5.10 Lipid og fettsyrer:

Lipider ble ekstrahert fra frysetørket materiale etter en modifisert metode av Blight og Dyer (1959) som beskrevet av Rainuzzo (1988). Frysetørket materiale ble ekstrahert med kloroform (CHCl_3): metanol (CH_3OH): og destillert vann (H_2O) (2:2:1,8). Kjent volum av kloroformfasen ble overført til små glassrør (veid på forhånd) som etter avdamping ble veid på nytt og total lipidinnhold ble bestemt gravimetrisk som mg/g tørrvekt. Intern standard, (21:0 metyl ester; Nuchek Prep, Minn., USA), ble tilsatt i kjent mengde (10% av lipidinnholdet i prøven) før lipidekstraksjonen. Lipidekstratet ble metylert med 12% BF_3 i metanol etter alkalisk hydrolyse (0,5M NaOH) etter en metode beskrevet av Metcalfe m.fl. (1966). Fettsyre metyl estere ble analysert med gass kromatograf (Carlo Erba HRGC 5160 utstyrt med glass kapillar kolonne (PAG^{TM} 30M * 0,32 med 0,25 μm film) med «on column» injeksjon. Kromatografiske topper ble registrert med en Shimadzu Chromatopac C-3RA integrator, identifisert ved sammenligning med kjente standarder (Nu-Chek Prep, Minn., USA) og kvantifisert i henhold til responsfaktoren til den interne standarden. Med unntak av *C. müelleri* (60% av μ_{maks}) ble det kjørt to paralleller.

Både totalt lipidinnhold og fettsyresammensetningen ble analysert av *Cand. scient.* Ingrid Overrein ved SINTEF Havbrukssenter.

2.6 Statistikk:

Gjennomsnittsverdier (\bar{X}) ble beregnet ved hjelp av ligning (2.22):

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n} \quad (2.22)$$

hvor $\sum x$ er summen av alle x verdiene og n er antall x verdier.

Det ble kun brukt STDAV i oppgaven. Standardavvikene (STDAV) ble beregnet ved ligning (2.23):

$$\text{STDAV} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad (2.23)$$

hvor $\sum x^2$ er summen av de kvadrerte x verdiene, $(\sum x)^2$ er summen av x verdier som er kvadrert og n er antall x verdier.

STDAV anslår standardavvik basert på et utvalg. Standardavviket er et mål på hvor mye verdier avviker fra en gjennomsnittsverdi. Hvis prøvedataene er normalfordelt, vil 68,26% av observasjonene ligge innenfor \pm standardavviket for gjennomsnittet, 31,34% vil falle utenfor (Sæther, 1998).

Korrelasjonskoeffisienten (r^2) ble beregnet ved minste kvadraters metode for å anslå hvor nært punktene lå regresjonslinjen. $r^2 = 0,83$ angir at 83 prosent av variasjonen til punktene gjenspeiles av regresjonslinjen. Typen regresjonslinje ble valgt slik at r^2 ble så nært opptil 1,0 som mulig.

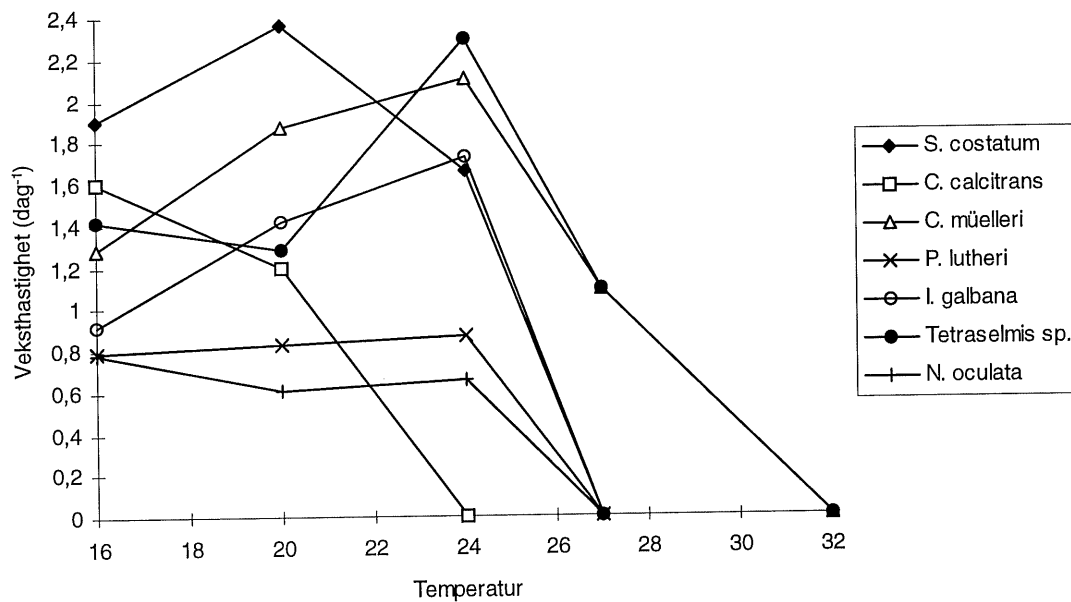
Statistisk analyse av signifikansnivåer ble utført ved en student t-test (Larsen og Marx, 1986). Signifikansnivået (p) ble satt til 0.05.

Alle data/figurer ble behandlet/tegnet i Excel 7,0 (Microsoft). Tekst og tabeller ble skrevet/laget i Word 7,0 (Microsoft).

3. RESULTAT

3.1 Batchkultur

3.1.1 Maksimal veksthastighet ved ulike temperaturer:



Figur 3.1: Maksimal veksthastighet (dag⁻¹) som funksjon av temperatur hos de ulike algeartene (pH 7,5-8,5).

Maksimal veksthastighet (μ_{maks} dag⁻¹) hos de ulike algeartene varierte med temperaturen (Fig. 3.1). Optimal temperatur var den temperaturen som totalt gav høyest vekst. *Tetraselmis sp.*, *C. müelleri*, *I. galbana* og *P. lutheri* hadde optimal temperatur ved 24°C, og μ_{maks} var da på henholdsvis 2.29, 2.1, 1.73 og 0.87 dag⁻¹. *S. costatum* hadde maksimal veksthastighet ved 20°C (2.36 dag⁻¹), mens *C. calcitrans* og *N. oculata* vokste hurtigst ved 16°C (henholdsvis 1,6 og 0,78 dag⁻¹). Samtlige algearter hadde en nedgang i veksthastighet når temperaturen økte mellom 24°C og 27°C, og det var kun *Tetraselmis sp.* og *C. müelleri* som overlevde ved temperaturer over 27°C. *P. lutheri* og *N. oculata* hadde små endringer i veksthastighet i temperaturområdet 16°C-24°C.

3.1.2 Antall celler/ml og mg karbon/l som funksjon av absorbans ved 750 nm:

Sammenhengen mellom optisk tetthet (OD) ved 750 nm (x) og henholdsvis antall celler per ml og mg karbon per liter (y) er gjengitt i tabell (3.1). Ligningene i tabell (3.1) ble beregnet som beskrevet i avsnitt (2.5.1).

Tabell 3.1: Sammenheng mellom optisk tetthet (OD) ved 750 nm (x) og henholdsvis antall celler per ml og mg karbon per liter (y) (pH 7,5-8,5, 20°C). r^2 = korrelasjonskoeffisient.

	Y= antall celler (mill)/ml		Gyldig	Y=C(mg)/l		Gyldig
	X= absorbans	r^2	område (OD)	X=absorbans	r^2	område (OD)
<i>S. costatum</i>	$y = 10,741x - 0,4968$	0,8264	0,015 - 0,8	$y = 215,05x - 13,68$	0,945	0,015 - 0,7
<i>C. calcitrans</i>	$y = 19,943x - 0,144$	0,9503	0,015 - 0,8	$y = 131,36x + 16,615$	0,5545	0,015 - 0,8
<i>C. müelleri</i>	$y = 8,1486x - 0,6662$	0,8909	0,015 - 1,0	$y = 200,51x - 13,246$	0,9795	0,015 - 1,0
<i>P. lutheri</i>	$y = 13,947x - 0,3925$	0,9918	0,015 - 1,5	$y = 199,67x - 0,5223$	0,9901	0,015 - 1,0
<i>I. galbana</i>	$y = 10,941x - 0,032$	0,9835	0,015 - 1,5	$y = 133,55x - 2,8055$	0,9553	0,015 - 1,0
<i>Tetraselmis</i> sp.	$y = 4,0433x - 0,2375$	0,9955	0,015 - 1,4	$y = 271,66x + 2,0642$	0,9543	0,015 - 1,2
<i>N. oculata</i>	$y = 26,313x - 0,2026$	0,9493	0,015 - 0,8	$y = 143,66x - 1,8992$	0,9672	0,015 - 0,7

3.1.3 pH:

Toleransen for pH endringer varierte mellom de ulike arter og innad i klassene (Tab. 3.2).

C. calcitrans, *S. costatum* (Bacillariophyceae), *P. lutheri* og *I. galbana* (Haptophyceae) hadde ingen vekst ved pH 6, mens *C. müelleri* (Bacillariophyceae), *Tetraselmis* sp. og *N. oculata* hadde μ_{maks} på henholdsvis 1.03, 1.18 og 0.43. Veksten ved pH 6 var lav i forhold til veksthastigheten ved pH 7,5-8,5. I basisk miljø utpekte *C. calcitrans* og *P. lutheri* seg som de artene som tålte høyest pH før veksten stagnerte. Veksten for disse to stagnerte først når pH nærmet seg 9,8. *S. costatum*, *C. müelleri* og *N. oculata* tålte ikke høyere pH enn omtrent 9,2, mens *I. galbana* og *Tetraselmis* sp. hadde toleransenivå på henholdsvis 9,6 og 9,4.

Tabell 3.2: Effekten av høy og lav pH i dyrkingsmediumet på vekst av de aktuelle algeartene (20°C).

Art	μ_{maks} ved pH 6	μ_{maks} ved pH 7,5-8,5	pH som gir stans i vekst
<i>S. costatum</i>	Ingen vekst	2,36	9,1-9,2
<i>C. calcitrans</i>	Ingen vekst	1,20	9,7-9,8
<i>C. müelleri</i>	1,03	1,87	9,1-9,2
<i>P. lutheri</i>	Ingen vekst	0,83	9,8
<i>I. galbana</i>	Ingen vekst	1,42	9,6
<i>Tetraselmis</i> sp.	1,18	1,28	9,3-9,4
<i>N. oculata</i>	0,43	0,61	9,1-9,2

Når algene ble dyrket uten tilførsel av ekstra CO₂, stagnerte veksten ved lavere biomasse enn når CO₂ ble tilført (Tab. 3.3). Med unntak av *C. müelleri* hadde samtlige arter dobbelt så stor biomasse i stasjonærfasen når pH ble holdt konstant rundt 8. Biomassen til *I. galbana* og *S. costatum* ble mer enn tredoblet.

Tabell 3.3: Biomassenivå (mg karbon/l) ved vekststagnasjon og forholdet mellom biomassen for algekulturer dyrket med (m) og uten (u) CO₂ (20°C).

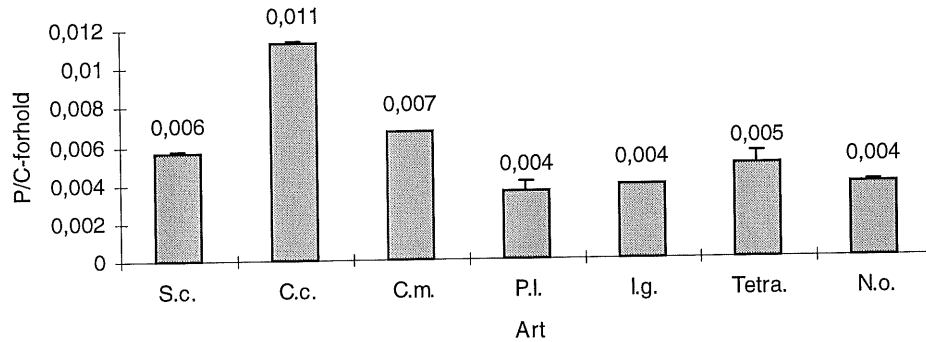
Art	mg karbon/l (N) uCO ₂	mg karbon/l (N) mCO ₂	N _{mCO₂} /N _{uCO₂}
<i>S. costatum</i>	57,3	173,4	3,03
<i>C. calcitrans</i>	58,7	119,1	2,03
<i>C. müelleri</i>	135,1	187,3	1,39
<i>P. lutheri</i>	219,1	418,8	1,91
<i>I. galbana</i>	74,7	264,3	3,54
<i>Tetraselmis</i> sp.	197,7	382,4	1,93
<i>N. oculata</i>	130,1	315,8	2,43

3.1.4 Forholdet mellom nitrogen, fosfor og karbon i stasjonærfase:

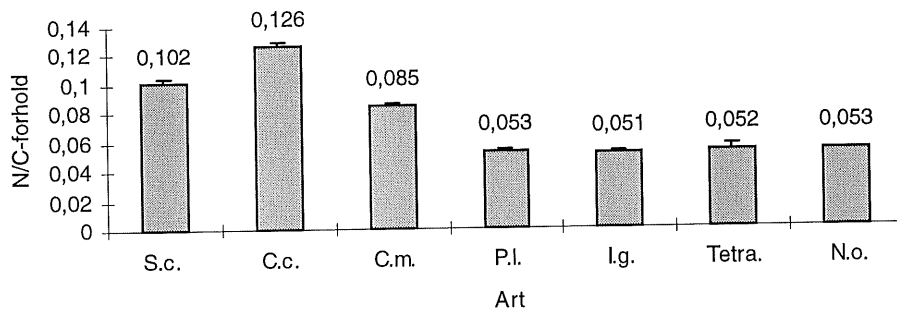
Det var et stort sprang mellom høyeste og laveste verdi for forholdet (vekt) mellom fosfor og karbon (Fig. 3.2). P/C verdiene varierte fra 0,004 (*I. galbana* og *P. lutheri*) og opp til 0,011 (*C. calcitrans*).

Tilsvarende trend fantes også for forholdet (vekt) mellom nitrogen og karbon (Fig. 3.3). Verdiene for Bacillariophyceae varierte fra 0,051 (*I. galbana*) til 0,126 (*C. calcitrans*).

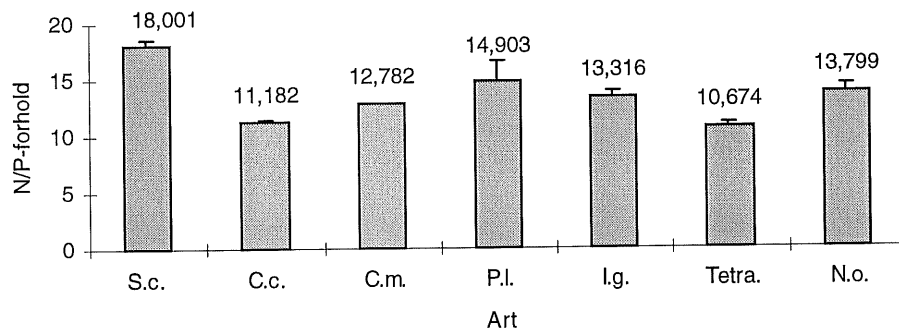
Nitrogen/fosfor forholdet (vekt) lå mellom 10,674 (*Tetraselmis* sp.) og 18,001 (*S. costatum*) (Fig. 3.4).



Figur 3.2: Forholdet (vekt) mellom fosfor og karbon (P/C) i stasjonærfase (pH 7.5-8.5, 20°C). S.c. = *Skeletonema costatum*, C.c. = *Chaetoceros calcitrans*, C.m. = *Chaetoceros mülleri*, P.l. = *Pavlova lutheri*, I.g. = *Isochrysis galbana*, Tetra. = *Tetraselmis* sp. og N.o. = *Nannochloropsis oculata*.



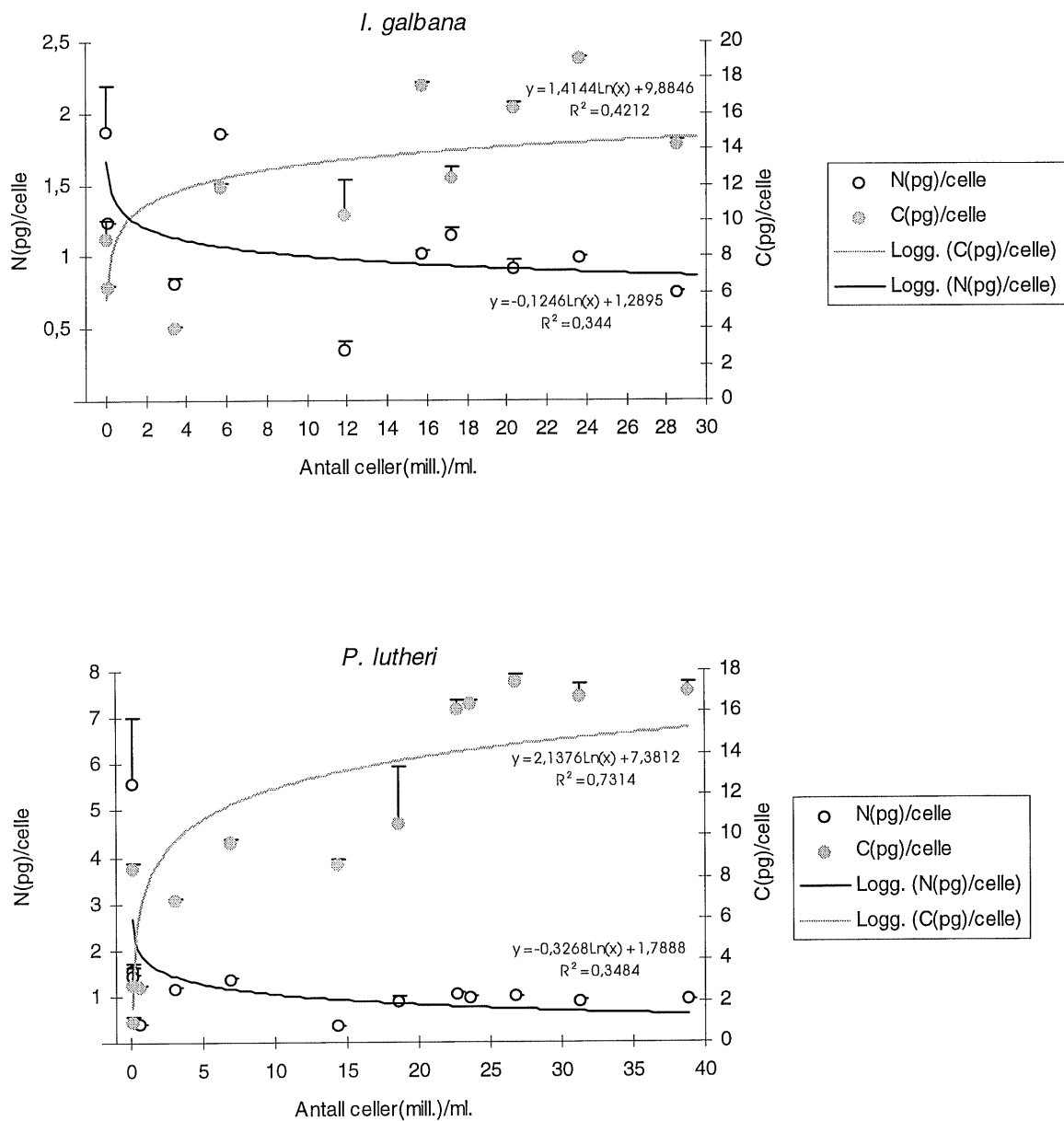
Figur 3.3: Forholdet (vekt) mellom nitrogen og karbon (N/C) i stasjonærfase (pH 7.5-8.5, 20°C).



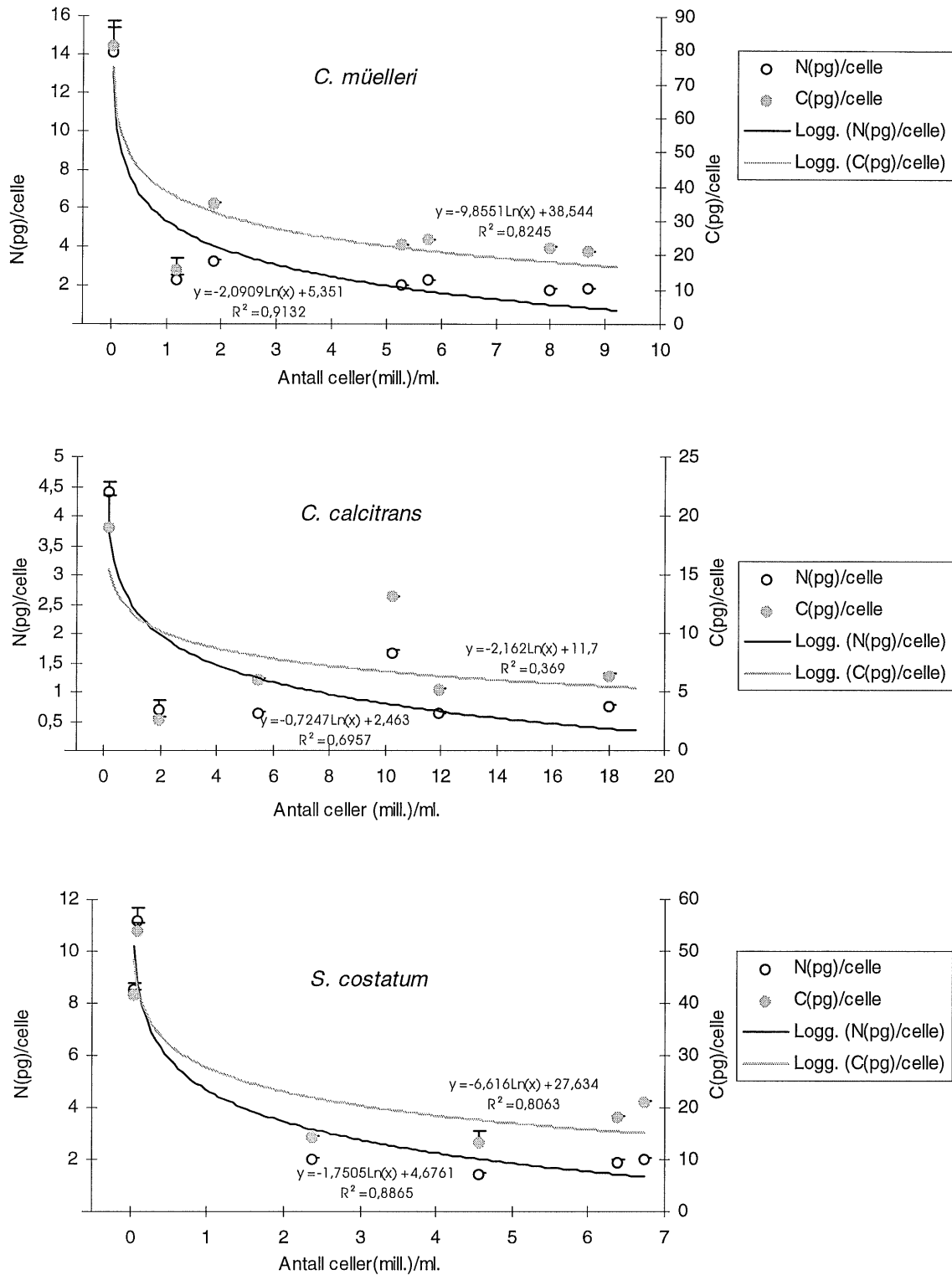
Figur 3.4: Forholdet (vekt) mellom nitrogen og fosfor (N/P) i stasjonærfase (pH 7.5-8.5, 20°C).

3.1.5 Karbon og nitrogeninnhold som funksjon av algetetthet:

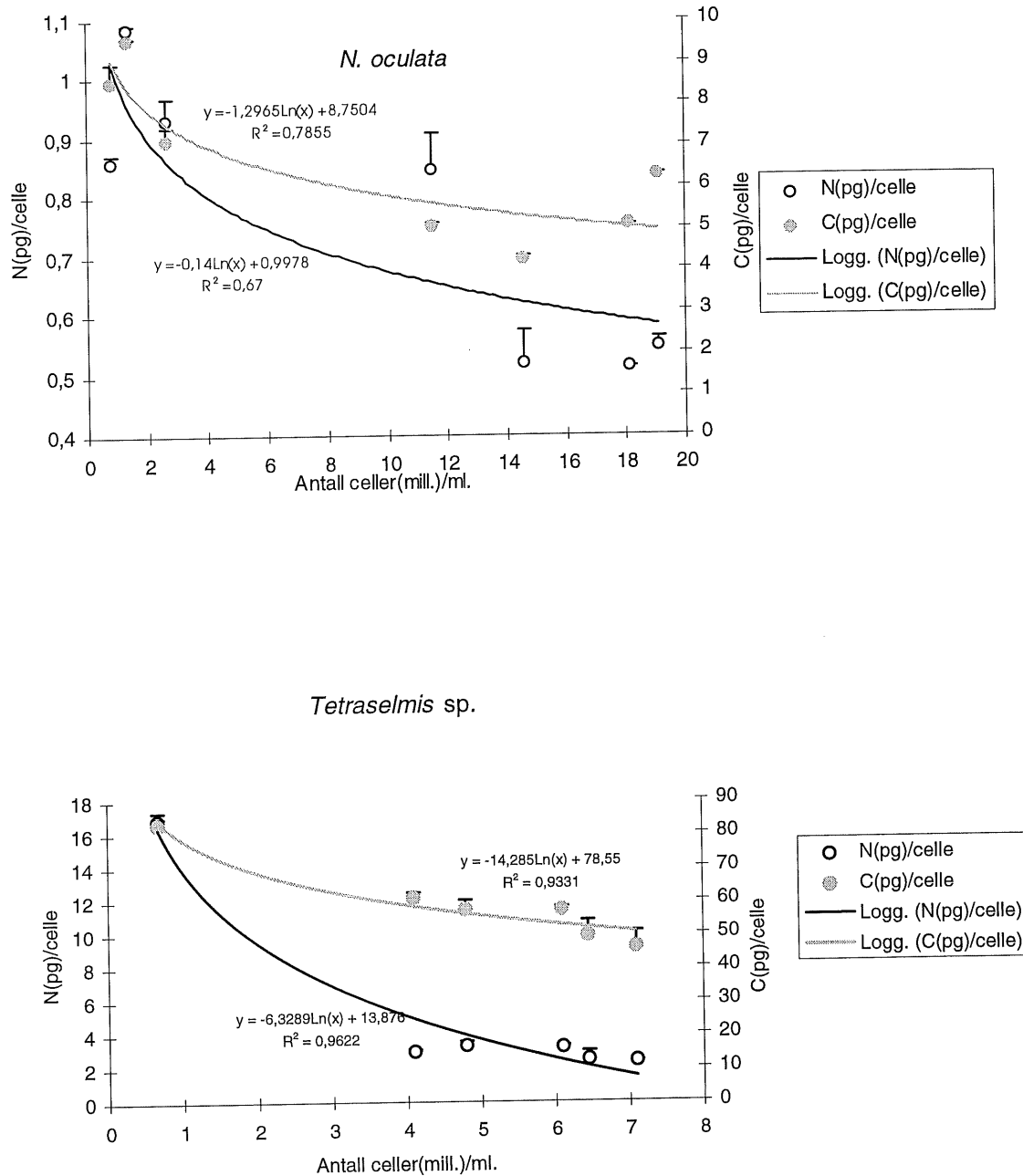
Mengden karbon og nitrogen per algecelle varierte som funksjon av celletettheten i algekulturen. Hos *I. galbana* og *P. lutheri* (Haptophyceae) økte karboninnholdet per algecelle med økende tetthet (Fig. 3.5a), mens karboninnholdet i de andre artene minket (Fig. 3.5b,c). Hos samtlige arter avtok nitrogeninnholdet per algecelle med tettheten i kulturene. Maksimalt karboninnhold varierte fra 83,19 pg/celle (*Tetraselmis* sp.; Fig. 3.5c) til 9,53 pg/celle (*N. oculata*; Fig. 3.5c), mens nitrogeninnholdet varierte fra 16,86 pg/celle (*Tetraselmis* sp.) til 1,08 pg/celle (*N. oculata*). Trendlinjene i figur (3.5abc) ble beregnet ved minste kvadraters metode gjennom punkter ved hjelp av formelen $y = c * \log x + b$, hvor c og b er konstante.



Figur 3.5a: Innhold av karbon (C) og nitrogen (N) per algecelle i pikogram (pg), ved økende celletetthet hos *I. galbana* og *P. lutheri* (pH 7.5-8.5, 20°C).



Figur 3.5b: Innhold av karbon (C) og nitrogen (N) per algecelle i pikogram (pg), ved økende celledetthet hos *C. mülleri*, *C. calcitrans* og *S. costatum* (pH 7.5-8.5, 20°C).

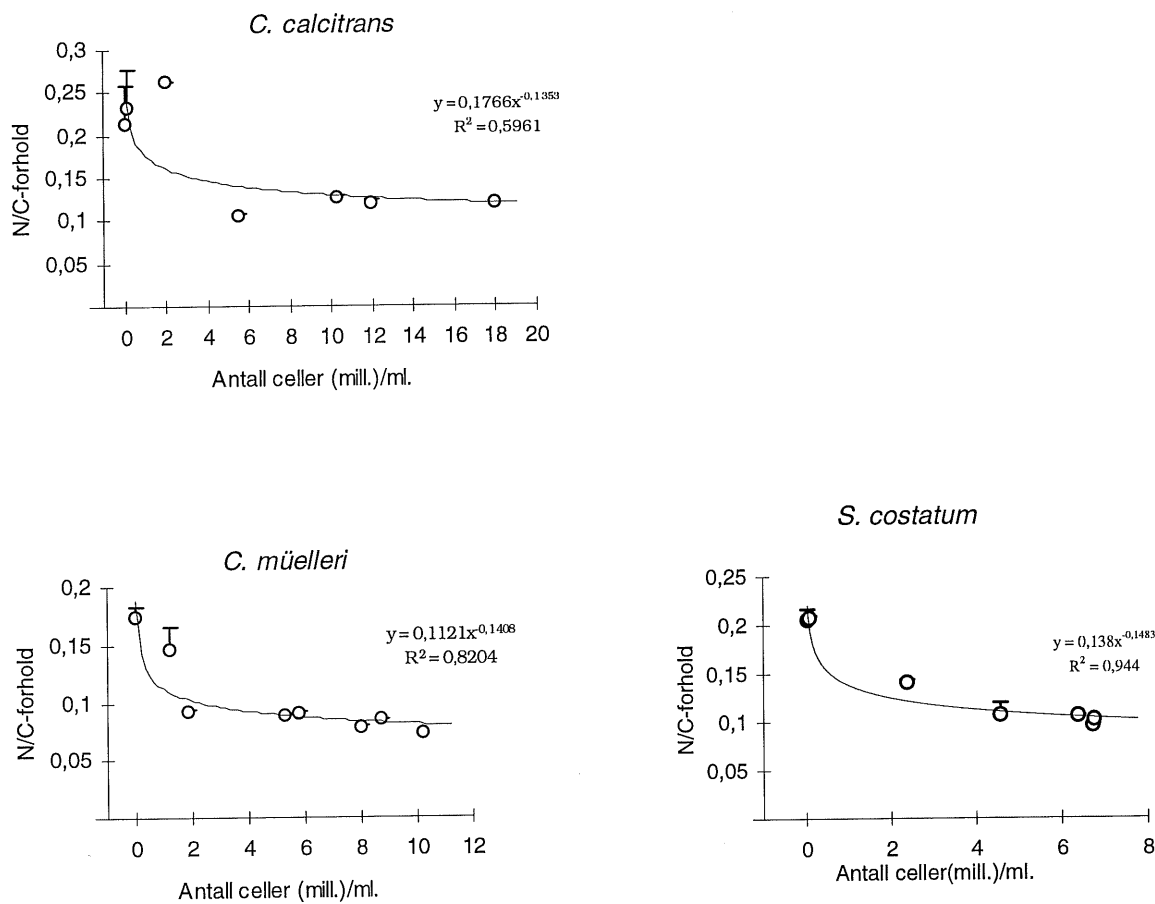


Figur 3.5c: Innhold av karbon (C) og nitrogen (N) per algecelle i pikogram (pg), ved økende celledetthet hos *N. oculata* og *Tetraselmis sp.* (pH 7.5-8.5, 20°C).

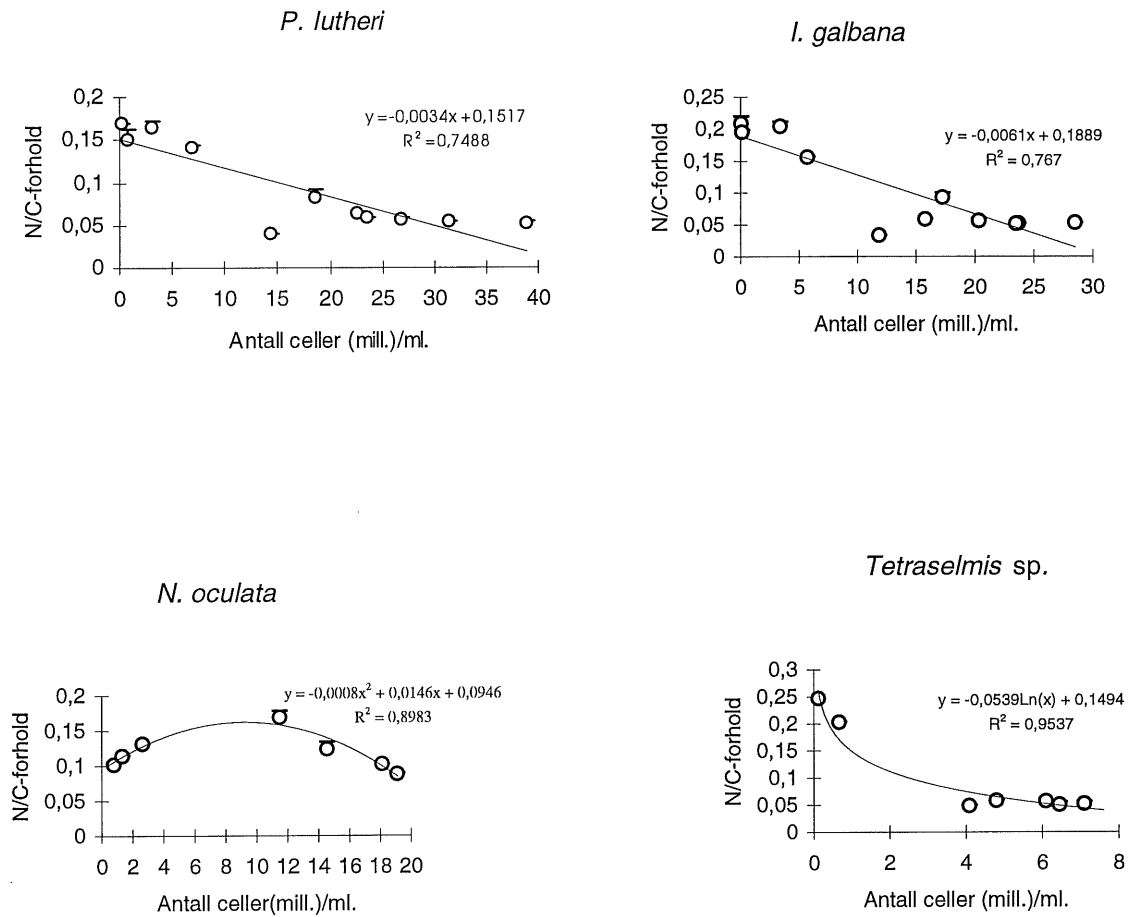
3.1.6 Forholdet mellom nitrogen og karbon (N/C) som funksjon av algetetthet:

Med unntak av *N. oculata* (Eustigmatophyceae) hadde nitrogen/karbon forholdet i algeartene en avtagende tendens ved økt celledetthet (Fig 3.6a,b). I *N. oculata* økte forholdet noe i starten, og avtok deretter ved høyere tettheter (Fig. 3.6a). Trendlinjene i figur (3.6a,b) ble beregnet ut

fra minste kvadraters metode, og trendmønsteret varierte mellom de ulike artene. Hos arter innen Bacillariophyceae endret N/C-forholdet seg etter et geometrisk mønster (Fig. 3.6a), mens Haptophyceae hadde en lineær trend (Fig. 3.6b). *Tetraselmis* sp. hadde en logaritmisk tendens, og nedgangen hos *N. oculata* ble representert med en polynom.



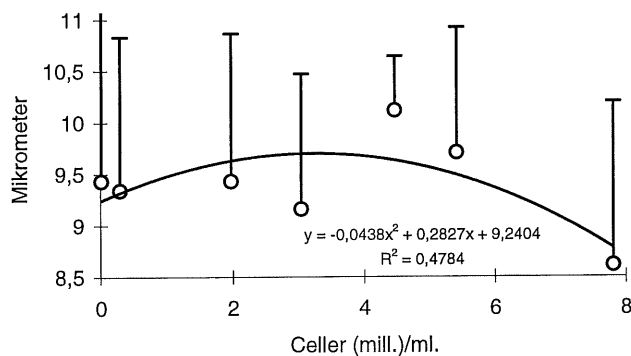
Figur 3.6a: Forholdet (vekt) mellom nitrogen og karbon (N/C) ved økende celletetthet hos *C. calcitrans*, *S. costatum* og *C. mülleri* (pH 7.5-8.5, 20°C).



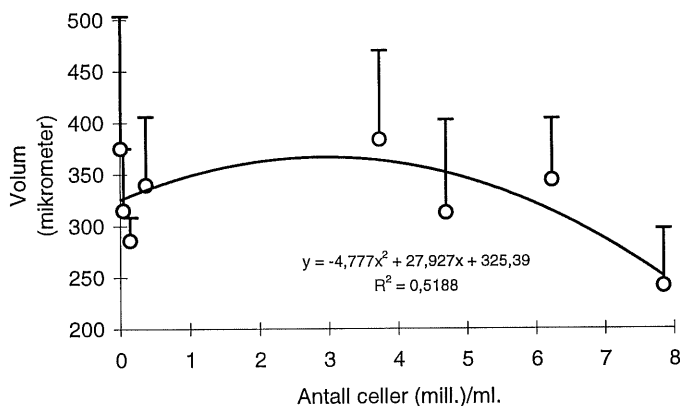
Figur 3.6b: Forholdet (vekt) mellom nitrogen og karbon (N/C) ved økende celledetthet hos *P. lutheri*, *I. galbana*, *N. oculata* og *Tetraselmis sp.* (pH 7.5-8.5, 20°C).

3.1.7 Cellestørrelse gjennom vekstfasen:

Ved økt celletetthet gikk gjennomsnittsstørrelsen (μm) til *C. müelleri* celler først opp for deretter å avta (Fig. 3.7). Volumet (μm^3) til en *Tetraselmis* sp. celle viste den samme tendensen (Fig. 3.8). Nedgangen i størrelse var ikke signifikant; $p = 0,51$ og $0,29$ for henholdsvis *C. müelleri* og *Tetraselmis* sp. Trendlinjene i figur (3.7) og (3.8) ble beregnet ut fra minste kvadraters metode gjennom en linje representert ved formel $y = b + C_1X + C_2X^2$, hvor b og C er konstanter.

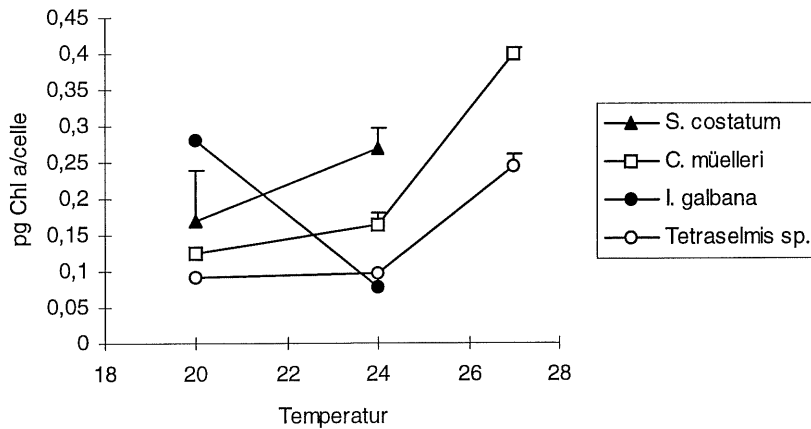


Figur 3.7: Størrelsen til algeceller av arten *C. müelleri* som funksjon av celletetthet i kulturen (pH 7.5-8.5, 20°C).



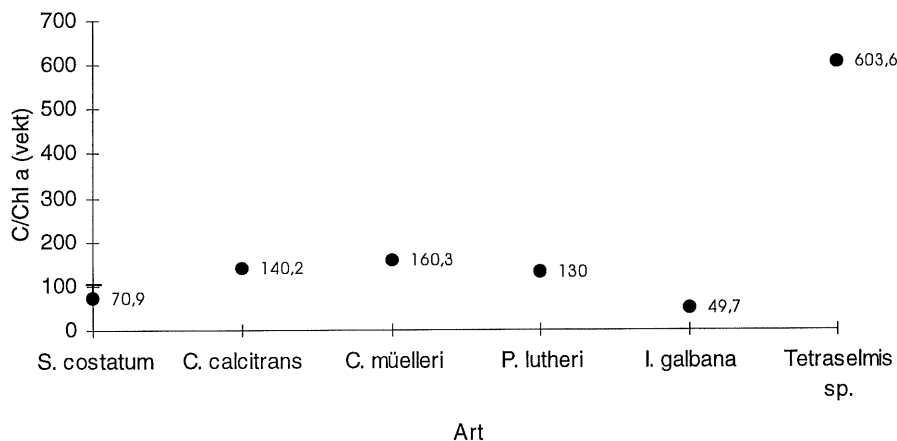
Figur 3.8: Volumet (μm^3) til algeceller av *Tetraselmis* sp. som funksjon av celletetthet i kulturen (pH 7.5-8.5, 20°C).

3.1.8 Klorofyll a:



Figur 3.9: Innhold av klorofyll a (pikogram) per algecelle som funksjon av temperatur (pH 7.5-8.5).

Hos *C. müelleri* (0,12-0,16 pg), *S. costatum* (0,17-0,27 pg) og *Tetraselmis sp.* (0,09-0,1 pg), gav en økning av temperaturen fra 20°C til 24°C økt innhold av klorofyll a per celle (Fig. 3.9). I det samme temperaturintervallet minket innholdet i *I. galbana* fra 0,28 pg til 0,08 pg. Ved 27°C inneholdt *C. müelleri* og *Tetraselmis sp.* henholdsvis 0,4 pg og 0,25 pg klorofyll a per celle.



Figur 3.10: Forholdet (vekt) mellom karbon og klorofyll a (C/Chl a) for de forskjellige artene (pH 7.5-8.5, 20°C).

Forholdet mellom karbon og klorofyll a (vekt) varierte mellom de ulike artene (Fig. 3.10). Innen klassen Bacillariophyceae hadde *C. müelleri* og *C. calcitrans* relativt likt C/Chl a

forhold, mens forholdet var lavere i *S. costatum*. *P. lutheri* og *I. galbana* (Haptophyceae) hadde forskjellige verdier. *Tetraselmis* sp. (Prasinophyceae), som er den største av algartene, hadde høyest C/Chl a forhold (604).

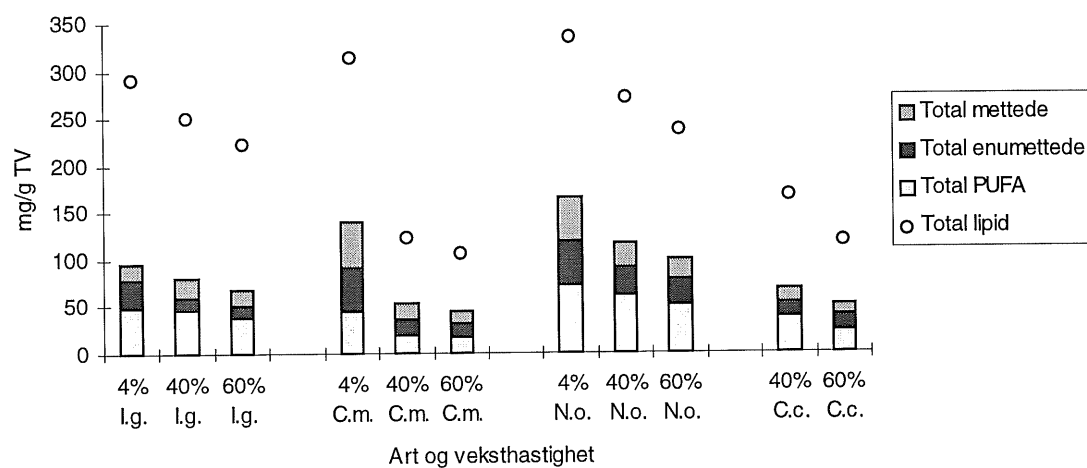
3.2 Semikontinuerligkultur

De fire algartene *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros müelleri* og *Chaetoceros calcitrans* ble også dyrket i semikontinuerligkultur i 200 l skala. På grunn av problemer med kontaminering av ciliater ble ikke *Chaetoceros calcitrans* dyrket ved 4% av μ_{maks} (Tab. 3.4).

Tabell 3.4: Daglig fortykning (liter) og antall celler (millioner/ml) ved høsting, ved 4%, 40% og 60% av maksimal veksthastighet (μ_{maks}) i 200 l kultur.

Art	4% av μ_{maks}		40% av μ_{maks}		60% av μ_{maks}	
	liter	mill./ml	liter	mill./ml	liter	mill./ml
<i>I. galbana</i>	11	7,74	87	4,13	115	2,05
<i>N. oculata</i>	5	24,79	43	11,11	62	5,85
<i>C. müelleri</i>	14	3,49	105	1,30	135	0,80
<i>C. calcitrans</i>			76	6,83	103	3,25

3.2.1 Lipidinnhold:



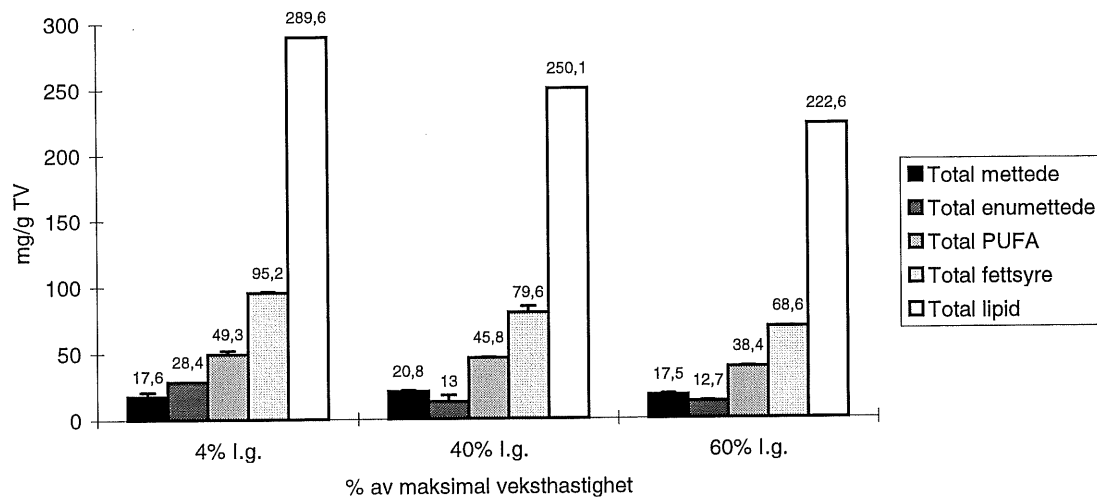
Figur 3.11: Kvantitativt innhold av total lipid, mettede-, enumettede- og flerumettede fettsyrer (PUFA), ved ulike veksthastigheter.

Graden av endring var avhengig av art og type fettsyre (Fig. 3.12). Samtlige arter viste en økning i totalfettsyre og totallipid innhold ved avtagende veksthastighet (Fig. 3.11).

Ved 4% av μ_{maks} hadde *N. oculata* høyest innhold av fettsyre per gram tørrstoff (165,5 mg/g TV; Fig. 3.14). *C. mülleri* hadde noe lavere innhold (140,8 mg/g TV; Fig. 3.13), etterfulgt av *I. galbana* (95,2 mg/g TV; Fig. 3.12) og *C. calcitrans* (67,8 mg/g TV; Fig. 3.15). Detaljert oversikt av fettsyre i alger er gitt i vedlegg (4-11).

3.2.2 Fettsyre- og lipidinnhold:

I. galbana

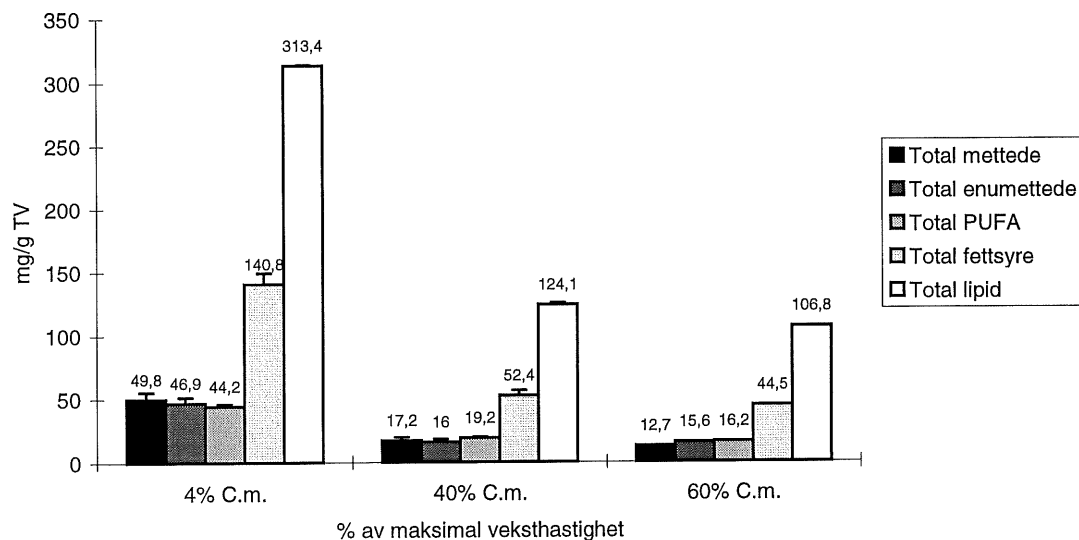


Figur 3.12: Endring i kvantitativt fettsyre og lipid innhold hos *Isochrysis galbana* ved ulike veksthastigheter.

I kulturer med *I. galbana* økte innholdet av totallipid ved redusert veksthastighet (fra 60% til 4% av μ_{maks} ; Fig. 3.12). Total mengde fettsyre økte også med avtagende veksthastighet, mens innholdet av mettede fettsyrer var relativt konstant ved overgang fra 4% - 60% av μ_{maks} . Ved samtlige veksthastigheter var innholdet av sum PUFA høyere enn enumettede- og mettede fettsyrer. Forholdet mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer minket ved redusert veksthastighet. Ved 60% var forholdet omtrent 1,3 mens det var 1,1 ved 4% (Fig. 3.16). Dette

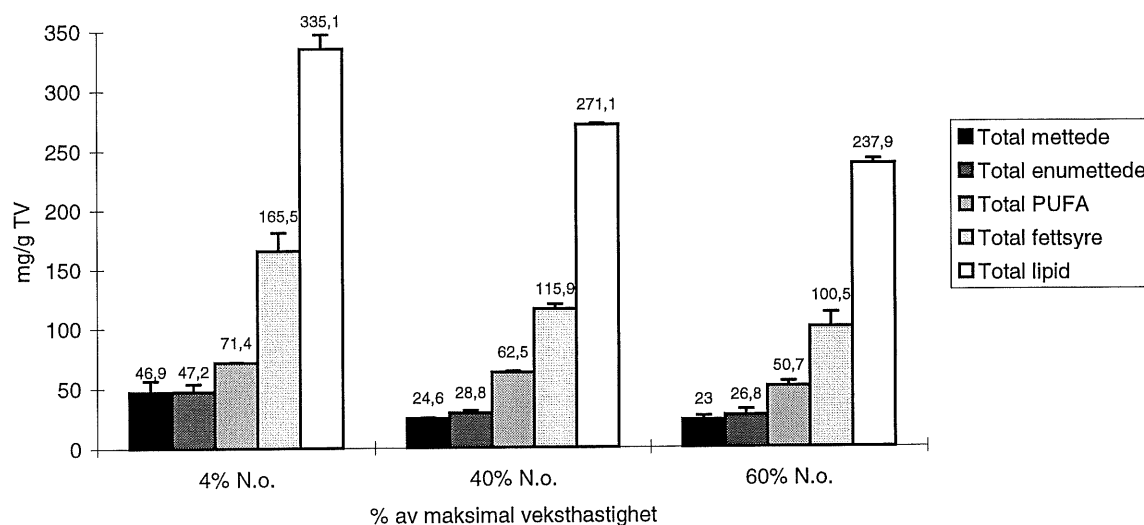
skyldes en stor kvantitativ økning i enumettede fettsyrer, spesielt 16:1. *I. galbana* inneholdt mye av følgende PUFA; 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 og 22:6 ω 3.

C. müelleri:



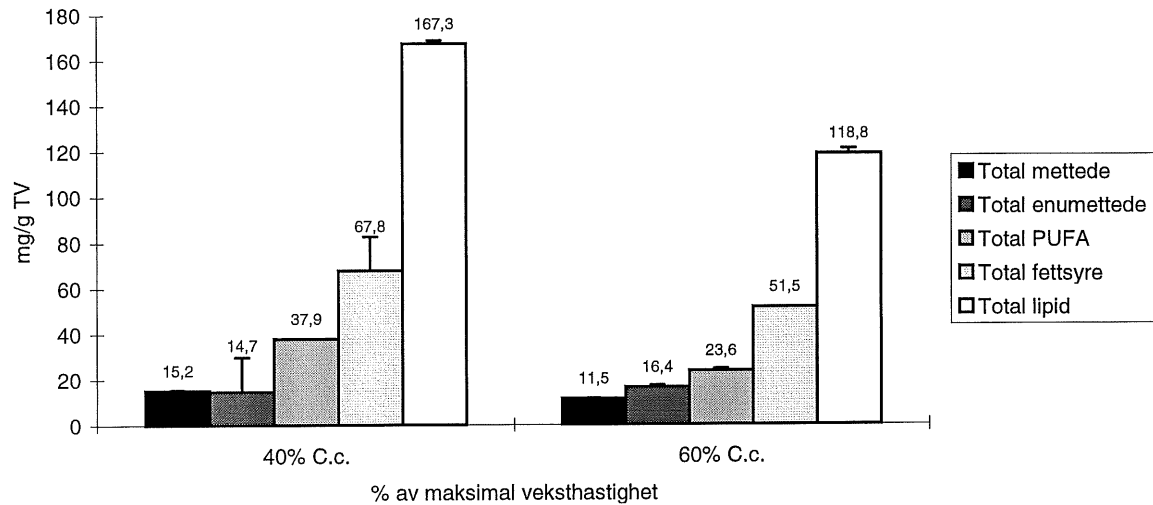
Figur 3.13: Endring i kvantitativt fettsyre og lipid innhold hos *Chaetoceros müelleri* ved ulike veksthastigheter.

I kulturer med *C. müelleri* økte innholdet av totallipid fra 106,8 til 313,4 mg/g TV (60% til 4% av μ_{maks}) ved redusert veksthastighet (Fig 3.13). Økningen av lipid og fettsyrer var svært stor mellom 40% og 4% av μ_{maks} . Kvantitativt innhold av mettede-, enumettede- og flerumettede fettsyrer økte også ved redusert veksthastighet. Ved 4% av μ_{maks} hadde *C. müelleri* en større kvantitativ mengde enumettede- og mettede fettsyrer enn PUFA. Ved 60% av μ_{maks} var forholdet mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer omtrent 0,6 mens det ved 4% var cirka 0,45 (Fig. 3.16). Dette skyldes en stor kvantitativ økning i mettede og enumettede fettsyrer, spesielt 16:0 og 16:1. *C. müelleri* inneholdt mye av følgende PUFA; 16:2 ω 4, 20:4 ω 6 og 20:5 ω 3.

N. oculata:

Figur 3.14: Endring i kvantitativt fettsyre og lipid innhold hos *Nannochloropsis oculata* ved ulike veksthastigheter.

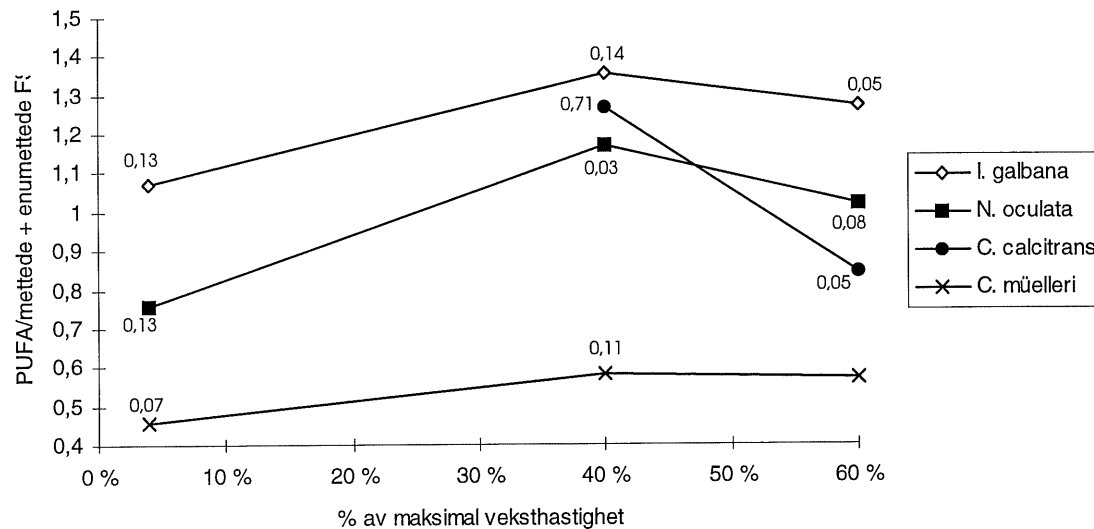
I kulturer med *N. oculata* økte det totale lipidinnhold fra 237,9 mg/g TV til 335,1 mg/g TV ved nedsatt veksthastighet fra 60% til 4% av μ_{maks} (Fig. 3.14). Kvantitativt innhold av mettede-, enumettede- og flerumettede fettsyrer økte ved redusert veksthastighet. Ved samtlige veksthastigheter inneholdt *N. oculata* mer PUFA enn enumettede- og flerumettede fettsyrer. Forholdet mellom PUFA og sum av mettede + enumettede fettsyrer minket fra omtrent 1,0 til 0,75 ved overgang fra 60% til 4% av μ_{maks} (Fig. 3.16). Dette skyldes en stor økning i mengden mettede- og enumettede fettsyrer, spesielt 16:0, 16:1 og 18:1 ω 9. *N. oculata* inneholdt mye av følgende PUFA; 20:4 ω 6 og 20:5 ω 3.

C. calcitrans:

Figur 3.15: Endring i kvantitativt fettsyre og lipid innhold hos *Chaetoceros calcitrans* ved ulike veksthastigheter.

I kulturer med *C. calcitrans* var det totale lipidinnhold 118,8 mg/g TV og 167,3 mg/g TV ved henholdsvis 60% og 40% av μ_{maks} (Fig 3.15). Det var bare de enumettede fettsyrene som ikke økte kvantitativt ved overgang fra 60% til 40% av maksimal veksthastighet. Ved begge veksthastigheter inneholdt *C. calcitrans* mer PUFA enn enumettede- og mettede fettsyrer. Forholdet mellom PUFA og gjennomsnittet av mettede + enumettede fettsyrer økte fra 0,8 til 1,25 ved minkende veksthastighet (Fig. 3.16). *C. calcitrans* inneholdt mye av følgende PUFA; 20:5 ω 3 og 16:3 ω 4.

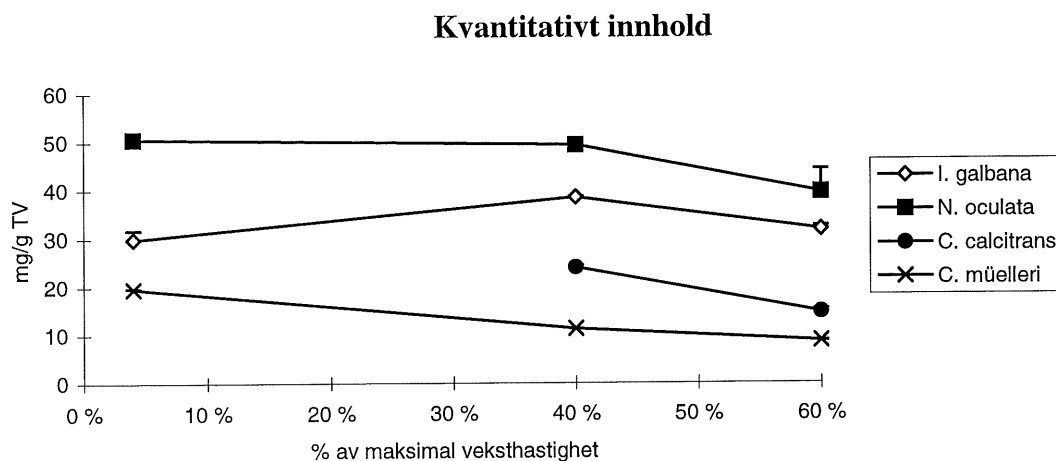
3.2.3 Forholdet mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer:



Figur 3.16: Forholdet (vekt) mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer (FS) ved ulike veksthastigheter. Standardavvik (STDAV) er oppgitt i figuren.

Hos samtlige arter var forholdet (vekt) mellom PUFA og sum mettede + enumettede fettsyrer størst ved 40% av μ_{maks} (Fig. 3.16). Ved 4% av μ_{maks} var forholdet minst.

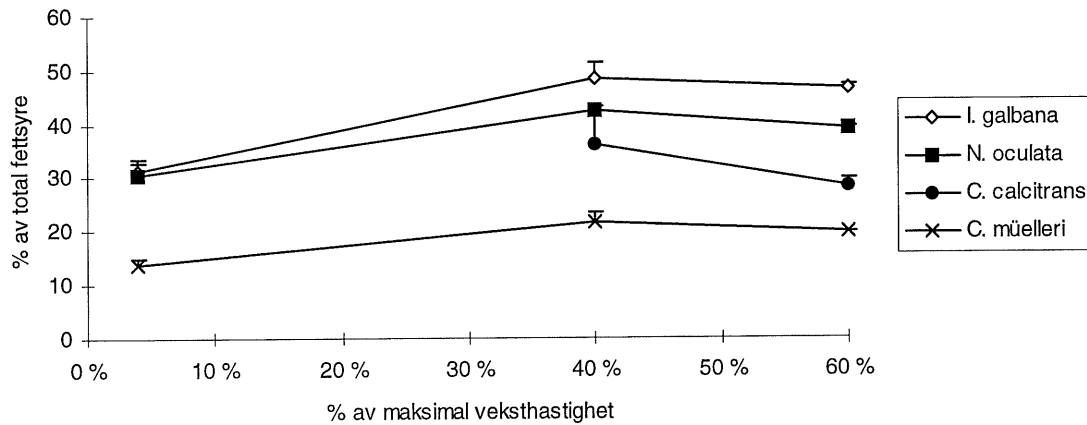
3.2.4 $\omega 3$ fettsyrer:



Figur 3.17: Kvantitativt innhold av $\omega 3$ fettsyrer ved ulike veksthastigheter.

Med unntak av *I. galbana* økte den kvantitative mengden av $\omega 3$ fettsyrer for samtlige arter når veksthastigheten gikk ned. *C. calcitrans* og *C. müelleri* inneholdt lite $\omega 3$, mens *N. oculata* rommet mest (Fig. 3.17).

Kvalitativt innhold



Figur 3.18: Kvalitativt innhold av ω 3 fettsyrer ved ulike veksthastigheter.

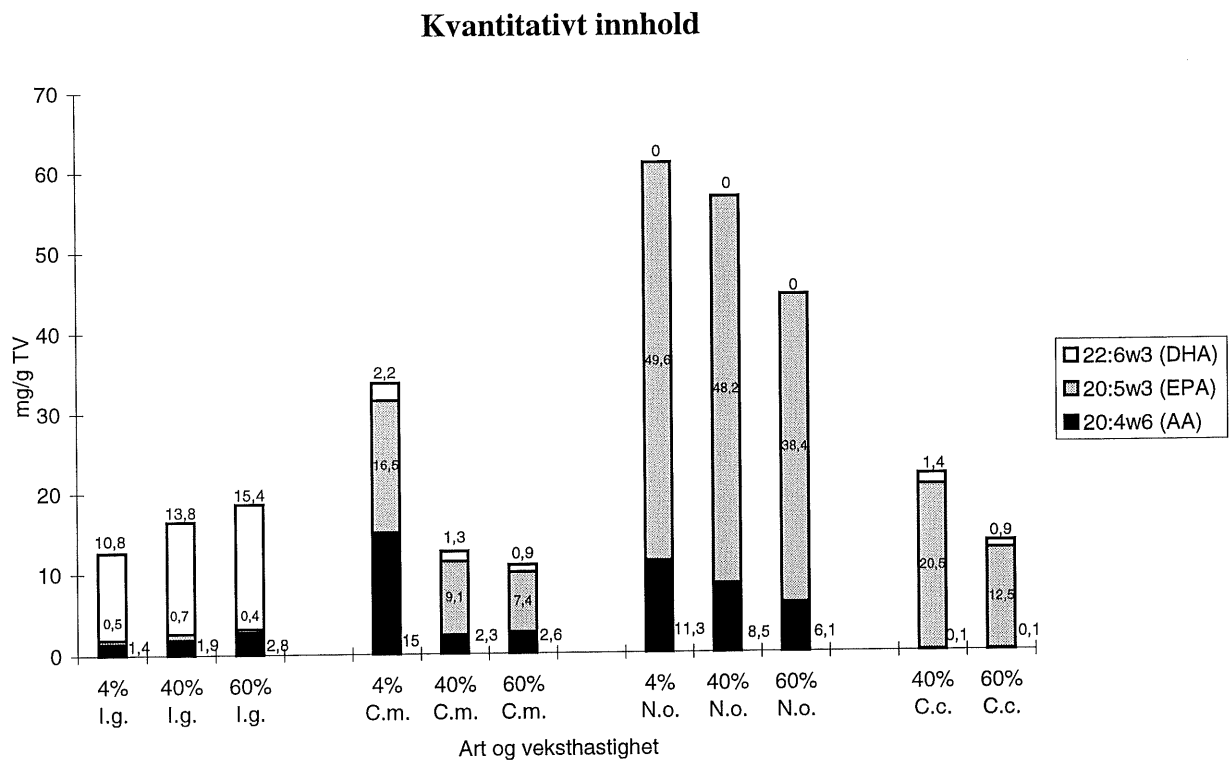
Hos samtlige arter økte relativt (prosent av total fettsyre) innhold av ω 3 fettsyrer fra 60%-40% av μ_{maks} (Fig. 3.18). Sett under ett var relativt innhold minst ved 4% av μ_{maks} .

Tabell 3.5: Stigningstall for ω 3 fettsyrer ved overgang fra 60%-40% av μ_{maks} .

	mg/g TV	% av total fettsyre
<i>I. galbana</i>	6,7x	2x
<i>N. oculata</i>	9,8x	3,3x
<i>C. calcitrans</i>	9,3x	7,6x
<i>C. müelleri</i>	2,6x	2x

Den absolutte stigningen mellom 60%-40% av μ_{maks} var større for kvantitativ (mg/g TV) mengde ω 3 fettsyrer, enn kvalitativ (prosent av total fettsyre) mengde.

3.2.5 Innhold av HUFA:



Figur 3.19: Kvantitativt innhold av fettsyrene DHA (22:6ω3), EPA (20:5ω3) og AA (20:4ω6) ved ulike veksthastigheter. Søylen er merket med tall som angir mengden av DHA (øverst), EPA (midten) og AA (nederst).

Innholdet av individuelle HUFA varierte sterkt med veksthastighet og art. Med unntak av *I. galbana* viste algeartene en tendens til økning i DHA, EPA og AA innhold (kvantitativt) når veksthastigheten avtok (Fig. 3.19).

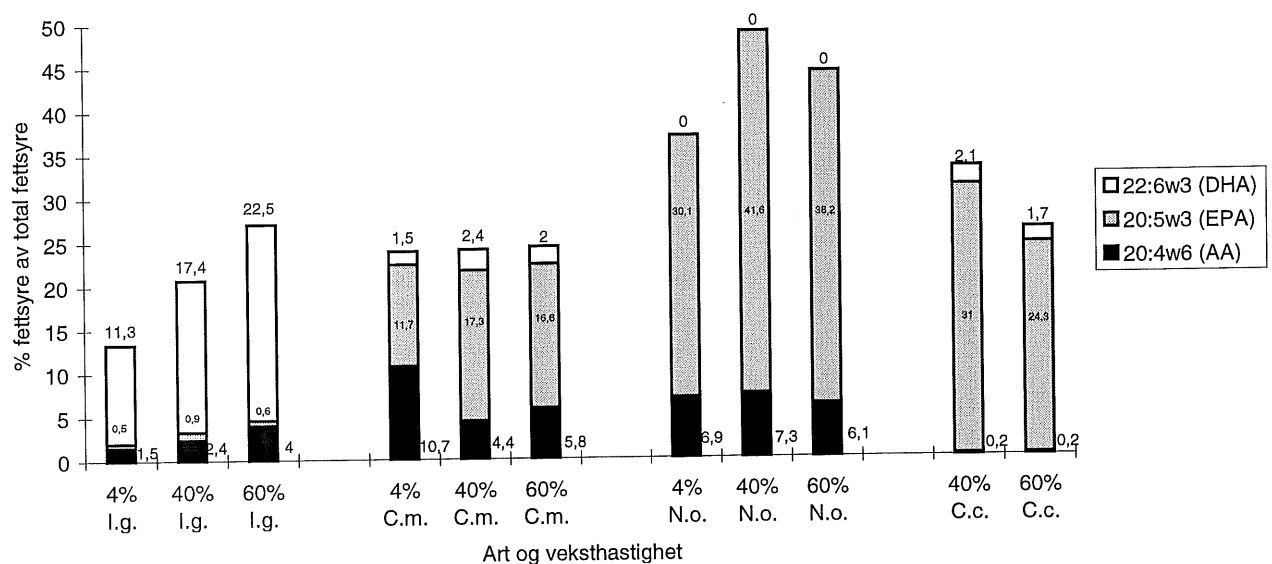
Hos *I. galbana* minket det totale innholdet av HUFA ved redusert veksthastighet. Mengden HUFA var 18,6 mg/g TV ved 60% og 12,7 mg/g TV ved 4% av μ_{maks} . *I. galbana* var den arten som hadde desidert størst kvantitativt innhold av DHA.

Fra 40% til 4% av μ_{maks} viste *C. mielleri* stor kvantitativ forandring i AA innhold. Mengden 20:4ω6 ble endret fra 2,3 mg/g TV til 15 mg/g TV. Ved 4% av μ_{maks} inneholdt *C. mielleri* lite DHA, men mye EPA og AA. Av artene som ble brukt i forsøket var det *C. mielleri* som hadde størst kvantitativt innhold av AA (4% av μ_{maks}).

Tørrstoff fra kulturer med *N. oculata* manglet DHA, men var rik på AA og EPA. Av artene i forsøket hadde *N. oculata* desidert høyest innhold av HUFA (60,9 mg/g TV (4% av μ_{maks})), og EPA utgjorde 81,4 prosent av dette.

Tørrstoff fra kulturer med *C. calcitrans* inneholdt lite DHA og enda mindre AA. EPA var den dominerende HUFA. *C. calcitrans* hadde ikke spesielt høyt kvantitativt innhold av hverken DHA, EPA eller AA.

Kvalitativt innhold



Figur 3.20: Kvalitativt innhold (prosent av total fettsyre) av fettsyrene DHA (22:6 ω 3), EPA (20:5 ω 3) og AA (20:4 ω 6) ved ulike veksthastigheter. Søylen er merket med tall som angir mengden av DHA (øverst), EPA (midten) og AA (nederst).

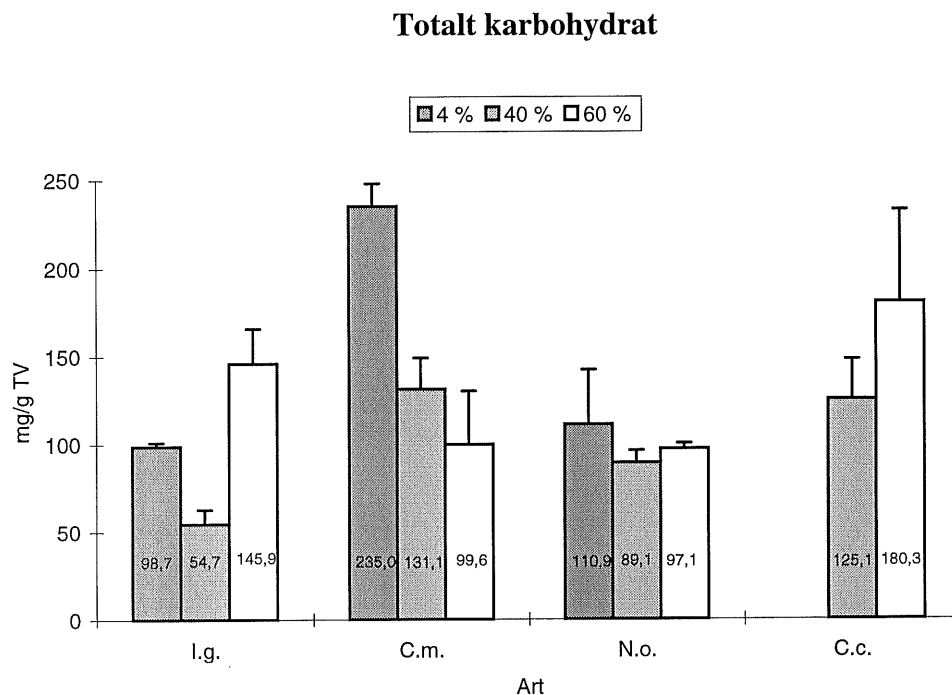
Hos *I. galbana*, minket det kvalitative innholdet av de aktuelle fettsyrer ved en nedgang i veksthastighet (Fig. 3.20). Ved 60% av μ_{maks} utgjorde HUFA 27,1 prosent av total fettsyre, mens de ved 4% utgjorde 13,3 prosent.

C. müelleri inneholdt omtrent like mye HUFA ved 4%, 40% og 60% av μ_{maks} (25 prosent av total fettsyre). Fra 40% til 4% av μ_{maks} var det en stor økning i AA og nedgang i EPA (Fig. 3.20).

Hos *N. oculata* avtok HUFA innholdet ved overgang fra 40% til 4% av μ_{maks} . Endringen skyldtes primært en kvalitativ nedgang i fettsyren EPA, mens innholdet av AA var tilnærmet konstant (Fig. 3.20).

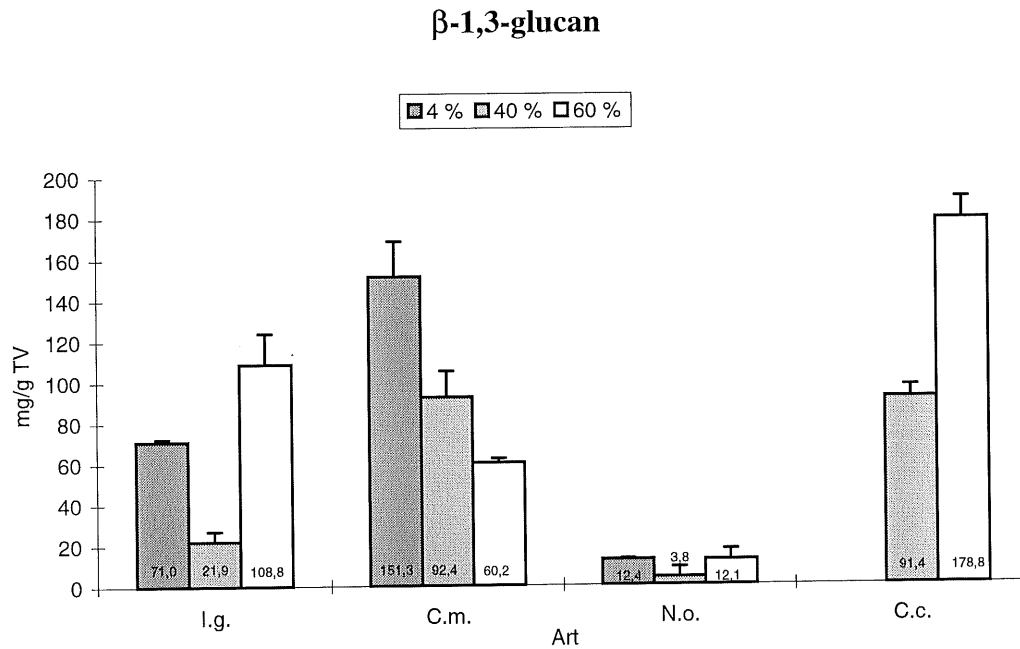
Som *C. müelleri* hadde *C. calcitrans* en økning i kvalitativt innhold av DHA og EPA ved overgang mellom 60% og 40% av μ_{maks} . Innholdet av AA var stabilt.

3.2.6 Karbohydrat:



Figur 3.21: Totalt karbohydratinnhold (mg/g tørrvekt) ved ulike veksthastigheter.

C. müelleri var den eneste arten som hadde en systematisk økning av totalt karbohydrat innhold ved overgang fra 60% til 4% av μ_{maks} (Fig. 3.21). *C. müelleri* inneholdt også mest karbohydrat av de studerte algartene (235,0 mg/g TV ved 4% av μ_{maks}). *C. calcitrans*, *I. galbana* og *N. oculata* hadde størst innhold av karbohydrat ved henholdsvis 60%, 60% og 4% av μ_{maks} .



Figur 3.22: Innholdet av polysakkaridet β -1,3-glucan (mg/g tørrvekt) ved ulike veksthastigheter.

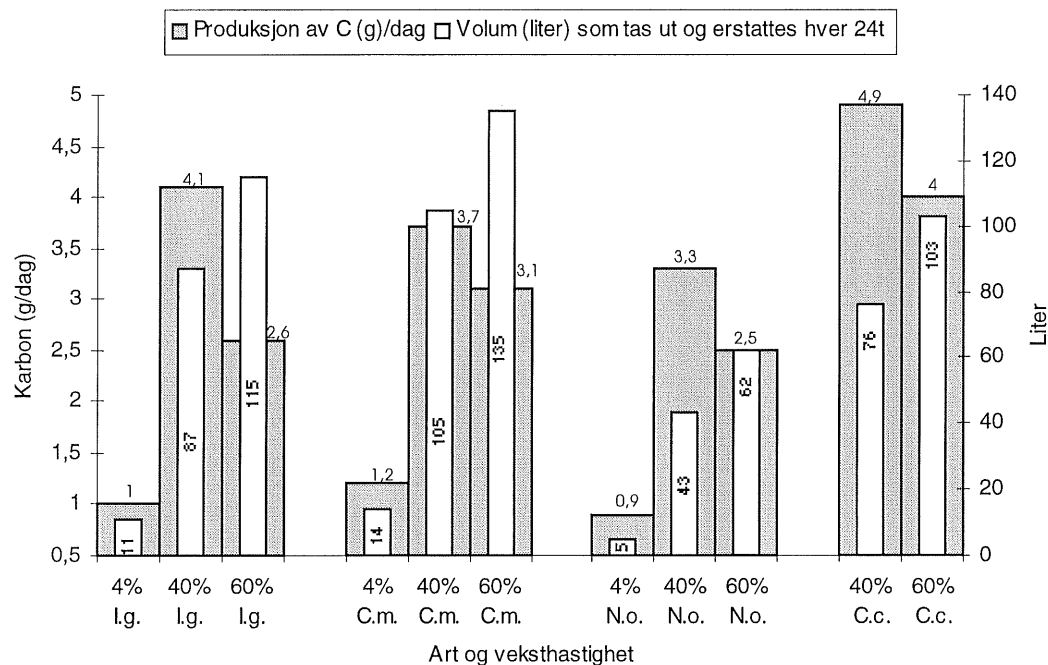
Innholdet av polysakkaridet β -1,3-glucan viste omtrent samme tendens som innholdet av totalt karbohydrat ved endring av veksthastigheten (Fig. 3.21 og 3.22). En forskjell var at tørrstoff fra *N. oculata* inneholdt svært lite β -1,3-glucan i forhold til de andre artene. Det var *C. müelleri* som inneholdt mest karbohydrat totalt (Fig. 3.21), men som figur (3.22) viser var det *C. calcitrans* som rommet mest β -1,3-glucan (178,8 mg/g TV ved 60% av μ_{maks}).

3.2.7 Produksjon av karbon, totallipid og totalkarbohydrat i stor kultur:

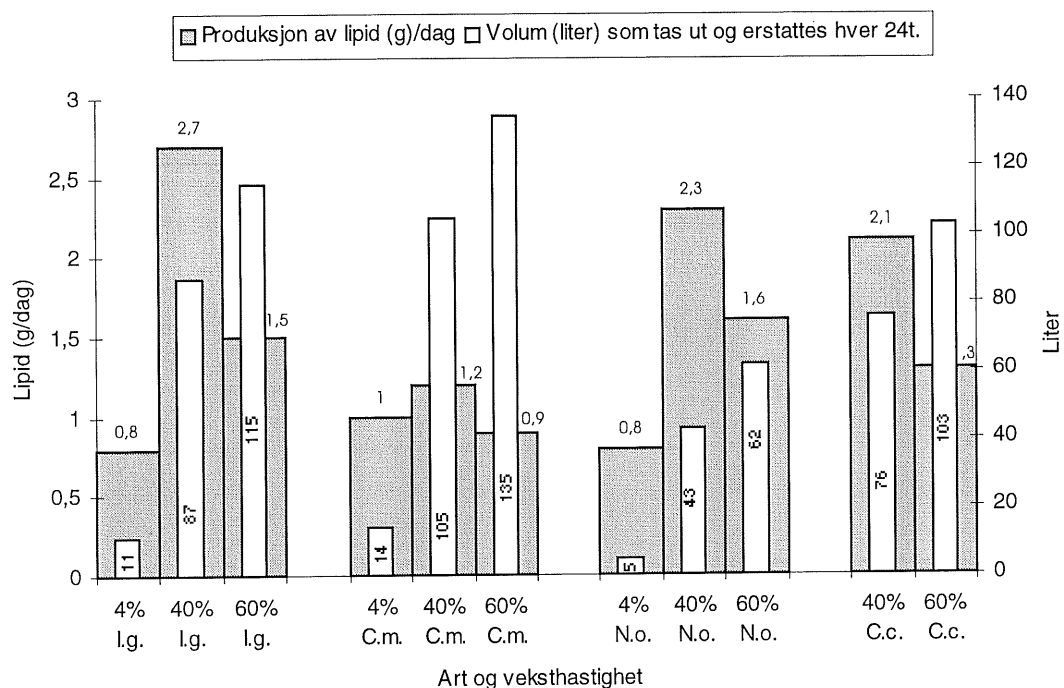
Daglig produksjon av karbon i 200 l kulturene varierte med veksthastigheten (Fig. 3.23). *C. calcitrans*, *I. galbana*, *C. müelleri* og *N. oculata* hadde størst produksjon ved 40% av μ_{maks} . Produksjonen var på henholdsvis 4,9, 4,1, 3,7 og 3,3 g karbon dag⁻¹.

Produksjonen av lipid avvike noe fra produksjonen av karbon (Fig. 3.23 og 3.24). Mest markant var det at *C. müelleri* produserte lite lipid i forhold til de andre artene i forsøket ved 40% og 60% av μ_{maks} . Totalt var det *I. galbana* som hadde størst produksjon av lipid; 2,7 g/dag (40% av μ_{maks}).

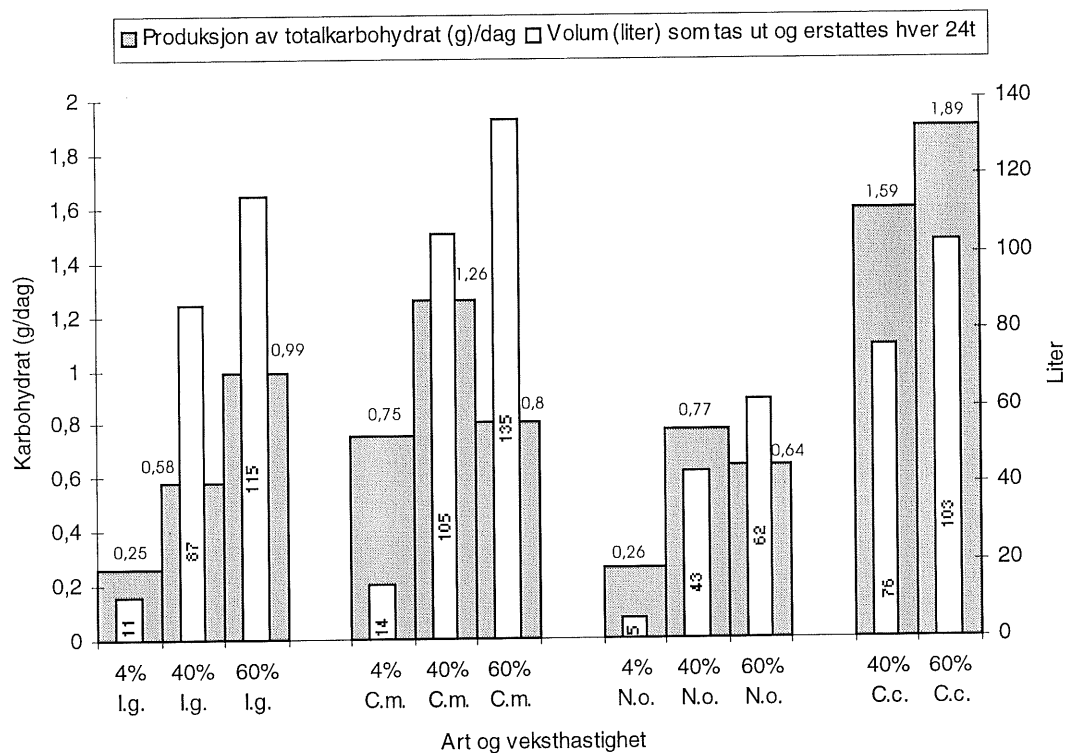
Sett i forhold til de andre artene produserte *C. müelleri* relativt mer karbohydrat enn lipid ved samtlige fortynningsgrader (Fig. 3.24 og 3.25). Av artene i forsøket hadde *C. calcitrans* størst karbohydratproduksjon med 1,89 g/dag (60% av μ_{maks}).



Figur 3.23: Produksjonsutbytte av karbon per døgn i 200 l kultur ved forskjellige veksthastigheter.



Figur 3.24: Produksjonsutbytte av totallipid per døgn i 200 l kultur ved forskjellige veksthastigheter.



Figur 3.25: : Produksjonsutbytte av totalkarbohydrat per døgn i 200 l kultur ved forskjellige veksthastigheter.

3.2.8 Produksjonsstabilitet:

Når mediumet var kloret forløp dyrkingen av *N. oculata*, *I. galbana* og *C. müelleri* uten større vansker ved samtlige veksthastigheter. Det gikk også bra å dyrke *C. calcitrans* i kloret medium ved 40% og 60% av μ_{maks} , men det oppstod problemer ved veksthastighet lik 4% av μ_{maks} . Problemet ved så lav fortynningsrate var først og fremst en stor oppblomstring av ciliaten *Euplotes* sp.

Det gikk ikke å dyrke *C. calcitrans* uten å klore vannet. Selv ved daglig veksthastighet lik 60% av μ_{maks} ble kulturen i løpet av noen dager infisert med ciliaten *Euplotes* sp. For å kunne dyrke *C. calcitrans* ved 4% av μ_{maks} ble det også gjort forsøk med fordoblet klormengde, resultatet var negativt, og problemet var fortsatt ciliater.

4. DISKUSJON

4.1 Dyrking av mikroalger

4.1.1 Temperatur:

Ser en vekk fra resultatene til *N. oculata* og *P. lutheri*, viste det seg at veksthastigheten til den enkelte algart var svært forskjellig ved ulike temperaturer (16-32°C; Fig. 3.1). *Tetraselmis* sp., *C. müelleri*, *I. galbana* og *P. lutheri* hadde optimal temperatur ved 24°C. *S. costatum* hadde maksimal veksthastighet ved 20°C, mens *C. calcitrans* og *N. oculata* vokste hurtigst ved 16°C. Samtlige algearter hadde en nedgang i veksthastighet når temperaturen økte mellom 24°C og 27°C, og det var bare *C. müelleri* og *Tetraselmis* sp. som hadde vekst ved 27°C.

Algartene alternerte om å ha høyest veksthastighet ved de forskjellige temperaturer, men det er viktig å være oppmerksom på at høy veksthastighet ikke nødvendigvis betyr at en art har høy produksjon av ønskede næringsstoffer. Resultatene forteller derfor at valg av dyrkingstemperatur er svært viktig for å optimalisere veksthastighet, og dermed produksjonspotensiale til den enkelte algart. Veksthastigheten til *N. oculata* og *P. lutheri* var lite påvirket av temperatur, og med tanke på produksjon vil valg av temperatur i området 16-24°C være av mindre betydning. Ved 30°C var det bare *Tetraselmis* sp. og *C. müelleri* som hadde vekst. Hvis *C. müelleri* kontamineres av andre algearter (av de som ble brukt i forsøket) enn *Tetraselmis* sp., kan det derfor være mulig å rense kulturene ved å dyrke dem ved omtrent 30°C.

Ved 24°C vokste *I. galbana* (1,73 dag⁻¹) dobbelt så fort som *P. lutheri* (0,87 dag⁻¹), mens *Tetraselmis* sp. hadde veksthastighet på 2,29 dag⁻¹. Resultatene stemmer lite overrens med tidligere observasjoner (Reitan m.fl., 1994b). Reitan (1994b) fant at veksthastighetene for *I. galbana* og *P. lutheri* lå rundt 1,15 dag⁻¹ ved 23-25°C, mens *Tetraselmis* sp. lå på 1,66 dag⁻¹. I gjeldende forsøk ble bunnfallet i kulturene rørt opp før prøvetaking, og forskjell i resultatene kan skyldes ulik høstemetode. Det er også verdt å merke seg at veksthastigheten til alger i gjeldende forsøk kun er et mål basert på absorbansmålinger ved 750 nm. *N. oculata* har rask celledeling (Flynn m.fl., 1993), og dersom det hadde blitt målt økning i antall celler per dag vil resultatene blitt annerledes. Ved bruk av denne metoden er det tidligere rapportert at *N. oculata* har høyere veksthastighet enn *I. galbana* (Flynn m.fl., 1993).

4.1.2 Klorofyll a innhold:

C. müelleri, *S. costatum* og *Tetraselmis* sp. fikk økt klorofyll a innhold per celle når de ble dyrket med økende temperatur (Fig. 3.9). Økning av klorofyll a innhold ved økt temperatur er tidligere vist av Molina m.fl. (1991) og Thompson m.fl. (1992), men klorofyll a mengden per celle var i disse tilfeller størst når temperaturen var optimal. Resultatene var derfor noe uventet da veksthastigheten til *S. costatum* går ned mellom 20°C og 24°C, mens veksthastigheten til *C. müelleri* og *Tetraselmis* sp. avtar fra 24°C til 27°C. Skygging kan ikke ha vært en årsak til de høye klorofyll a mengdene per celle, da tettheten ved høsting var mindre ved temperaturer over optimal temperatur. *I. galbana* inneholdt mer klorofyll a per celle ved 20°C enn 24°C. Dette er ikke i samsvar med Thompson m.fl. (1992), og mitt resultat skyldes nok at tettheten til *I. galbana* var størst ved 20°C. I stedet for å høste i stasjonærfase, skulle prøver til klorofyll a analyser blitt tatt ut ved en bestemt cellekonsentrasjon, da dette ville gitt bedre sammenligningsgrunnlag mellom de ulike temperaturer.

Klorofyll a brukes ofte som en parameter for å beregne biomassen i naturlige algesamfunn (Parson m.fl., 1984; Odate m.fl., 1993). Bruk av metoden har vist seg å være problematisk da forholdet mellom karbon og klorofyll a varierer hos alger (Odate m.fl., 1993). Resultatene viser at det i stasjonærfasen var stor variasjon i karbon:klorofyll a forholdet (vekt) mellom de forskjellige klasser og arter (Fig. 3.10). Forholdet varierte fra 49,7 (*I. galbana*) til 140,2 (*C. calcitrans*) for arter mindre enn 10 µm, og fra 160,3 (*C. müelleri*) til 603,6 (*Tetraselmis* sp.) for arter større enn 10 µm (Tab. 2.1). Dette er i samsvar med resultater rapportert av Furuya (1990) hvor det også ble vist at små algearter (2-10 µm) har lavere karbon:klorofyll a forhold enn arter >10 µm. Som tidligere rapportert av Strathmann (1967), bør en derfor ved utregning av biomasse fra klorofyll a konsentrasjon ta hensyn til størrelsen til algeartene.

4.1.3 pH:

Uten noen form for pH kontroll i algekulturene vil basisiteten i vekstmediumet øke fra eksponentiell til stasjonærfase. I forsøket ble surhetsgraden i kulturene regulert ved tilsats av ekstra CO₂.

Når kulturene ble innokulert ved pH 6, var det kun *C. müelleri*, *N. oculata* og *Tetraselmis* sp. som hadde vekst (Tab. 3.2). For disse artene var maksimal veksthastighet (dag⁻¹) lavere enn

ved pH 7,5-8,5, og da spesielt for *C. müelleri*. Ved forsøk uten tilsats av ekstra CO₂ fikk ingen av algekulturene vekststans før pH 9,1. *P. lutheri* og *C. calcitrans* tålte pH helt oppimot 9,8 før veksten stagnerte.

Vekst i kulturer uten ekstra tilførsel av CO₂ var karakterisert ved lav biomasse i stasjonærfase (Tab. 3.3). Kulturer som ble dyrket uten tilsats av CO₂ hadde mellom 1,39 (*C. müelleri*) og 3,54 (*I. galbana*) ganger mindre biomasse i stasjonærfase enn kulturer hvor pH ble holdt mellom 7,5 og 8,5. Dette indikerer at høy pH eller mangel på karbon begrenset veksten, og ikke fosfor.

Resultatene tilsier at pH bør holdes i området 7,5-8,5 for å optimalisere vekstforholdene til mikroalgene og dermed produksjonen. Ved dyrking av *S. costatum*, *C. calcitrans*, *P. lutheri* og *I. galbana* er det viktig å være oppmerksom på at pH ned mot 6 vil kunne drepe algecellene. Hvis man benytter pulsvis tilsetning av CO₂ ved produksjon av de nevnte arter, bør en bruke svært små mengder CO₂ i innokuleringsfasen, og øke suksessivt med tettheten på kulturen. Hvis det ikke tilsettes CO₂ vil veksten i kulturen stagnere ved en lavere biomasse, og produksjonen i kulturene blir mindre på grunn av pH eller karbonbegrensning. Med andre ord utnyttes produksjonspotensialet til dyrkingsvolumet dårlig, og ved bruk av kunstig oppvarmet vann er dette svært lite økonomisk. For å unngå lav biomasse og celledød som følge av store svingninger i pH, kan det være bedre å benytte kontinuerlig innblanding av CO₂ ved hjelp av et rotameter. Denne metoden vil kunne gi mer stabil pH, men forbruket av CO₂ kan bli større.

4.1.4 Nitrogen, fosfor og karbon:

Både N/C og P/C forholdet (vekt) i stasjonærfase i småkultur var lavere enn hva som er antatt for nitrogen (0,163 - 0,186) og fosfor (0,016 - 0,044) mettede celler (Fig. 3.3 og Fig. 3.2; Sakshaug og Olsen, 1986). N/P forholdene var 10,7 hos *Tetraselmis* sp. og 11,18 hos *C. calcitrans*, mens de resterende artene lå fra 12,8 og oppover (Fig. 3.4). For *Tetraselmis* sp. og *C. calcitrans* var N/P forholdene noe lavere enn det som er beregnet for fosforbegrensende alger (11,76; Sakshaug og Olsen, 1986), men samtidig høyere enn N/P nivået som er antatt for næringsmettede alger (7,1±2,6; Olsen og Jensen, 1989). På grunnlag av dette det antas det at også *Tetraselmis* sp. og *C. calcitrans* var begrenset av fosfor. De lave P/C og høye N/P

forholdene i algene i stasjonærfase tilsier at mikroalgene som ble dyrket i småkultur trolig var fosforbegrenset.

Karbon og nitrogeninnholdet per celle endret seg som en funksjon av tetthet i kulturene. Hos *I. galbana* og *P. lutheri* (Haptophyceae) økte karboninnholdet per celle med tetthet i kulturen, mens nitrogeninnholdet avtok (Fig. 3.5a). Når det gjelder *I. galbana* er det tidligere vist en lignende tendens, mens *P. lutheri* er rapportert å ha størst biomasse i logaritmisk fase (Brown m.fl., 1993). I de andre artene minket både karbon og nitrogeninnholdet med økt celledetthet (Fig. 3.5bc), og i samsvar med resultatene er det rapportert at *N. oculata* rommer mest biomasse per celle i logfasen (Brown m.fl., 1993). Ved økt fosforbegrensning ble det ikke funnet noen signifikant endring i størrelsen til *C. müelleri* og *Tetraselmis* sp. (Fig. 3.7 og Fig. 3.8). Men da karboninnholdet ved fosforbegrensning endret seg fra 80 til 20 pg/celle hos *C. müelleri*, og fra 83 til 45 pg/celle hos *Tetraselmis* sp., er det likevel sannsynlig at celledettheten går ned. De motstridende resultatene kan skyldes at metoden som ble brukt ved måling av celledetthet ikke var nøyaktig nok.

Ser en endringen i karboninnhold (biomasse) per celle i sammenheng med anbefalt førmengde for skjellyngel, får resultatene stor betydning. Yantian og Norman (1996) anbefalte en førmengde på 10-20 algeceller $\mu\text{l}^{-1} \text{dag}^{-1}$ for skjellyngel (*Argopecten irradians concentricus* Say). I nevnte forsøk dreide det seg om *I. galbana*, dyrket ved cirka 30% av μ_{maks} i semikontinuerligkultur. I gjeldende forsøk varierte innholdet i *I. galbana* og *P. lutheri* (Haptophyceae) mellom 7 og 15 pg C/celle, og da med størst karboninnhold ved høy celledetthet. Når karbonmengden i algecellene varierer så mye med grad av begrensning, er det viktig å skille mellom biomassen i algeceller som er hentet fra kulturer med høy eller lav tetthet. Hvis for eksempel *I. galbana* høstes ved stor tetthet, vil 10 algeceller tilsvare en større biomasse enn når høstingen skjer ved lavere tetthet. I forsøket varierte karbonmengden fra 8 pg/celle (*N. oculata*) til 80 pg/celle (*Tetraselmis* sp.), og det vil derfor heller ikke være rett å overføre førkonsentrasjonen for *I. galbana* til andre mindre eller større arter. Da det er vist at skjellvekst er en funksjon av karboninnhold (mg/g TV) i algecellene (Thompson m.fl., 1994), anbefales det for fremtiden å opplyse om kvantitativ mengde karbon/mikroliter i skjell dyrkingstanken, istedet for antall celler/mikroliter. Dette vil gi en bedre oversikt over faktisk tilbudt næringsmengde.

Minkende N/C forhold er et resultat av konstant lipid og/eller karbohydratsyntese kombinert med redusert celledelingsrate og proteinsyntese på grunn av redusert tilgang på næringsstoffer (Siron m.fl., 1989; Sukenik og Livne, 1991). Avtagende N/C forhold tilsier at proteinmengden per gram tørrvekt avtar ved økt celletetthet (Harrison m.fl., 1990; Molina m.fl., 1991; Sukenik m.fl., 1993). For alger som ikke var næringsbegrenset lå N/C forholdet (vekt) i gjeldende forsøk mellom 0,25 (*C. calcitrans* og *Tetraselmis* sp.; Fig. 3.6ab) og 0,1 (*N. oculata*; Fig. 3.6b). For de fleste artene var dermed N/C forholdet noe høyere enn hva som tidligere er rapportert (0,163-0,186; Sakshaug og Olsen, 1986). Med unntak av *N. oculata* viste forholdet mellom nitrogen og karbon en avtagende tendens ved økt celletetthet. I klassen Haptophyceae viste artene en lineær avtagende trend, mens arter fra Bacillariophyceae hadde en geometrisk minkende trend. En lineær trend er tidligere vist for *I. galbana* (Dahle, 1994). Ved økt celletetthet minket også N/C-forholdet hos *Tetraselmis* sp., men her ble tendensen best beskrevet med en logaritmisk funksjon. Hos *N. oculata* økte N/C-forholdet for deretter å avta ved høyere cellekonsentrasjoner, og trendlinjen som passet best var en polynom. Resultatene for *N. oculata* tilsvarer de som ble funnet av Flynn m.fl. (1993). Måten *N. oculata* tar opp nitrogen på kan muligens tyde på at denne arten kan lagre tilgjengelig nitrogen.

4.2 Veksthastighet og fôrkvalitet

4.2.1 Totallipid:

Samtlige av de undersøkte artene hadde en økning i totallipidinnhold med avtagende veksthastighet (Fig. 3.11). Lignende resultat er tidligere rapportert for *C. calcitrans*, *I. galbana* og *N. oculata* (Whyte, 1987; Brown m.fl., 1993; Reitan m.fl., 1994b). Totalt var det *N. oculata* som inneholdt mest lipid (335,1 mg/g TV ved 4% av μ_{maks}), mens *C. müelleri* hadde et minimum innhold på 106,8 mg/g TV (60% av μ_{maks}). Imidlertid hadde *C. müelleri* en svært stor økning av totallipid ved overgang mellom 40% og 4% av μ_{maks} . I gjeldende forsøk inneholdt *N. oculata* mer totallipid enn hva som tidligere er blitt rapportert (Brown, 1991; Brown m.fl., 1993). Brown (1991) og Brown m.fl. (1993) gjorde forsøkene under forhold med 12t lys:mørke, og forskjellen i resultat kan skyldes de ulike lysregimene. Lipidnivået som ble funnet hos *I. galbana* og *C. calcitrans* samsvarer med tidligere forsøk (Whyte, 1987; Reitan m.fl., 1994b).

4.2.2 Fettsyrer

Fettsyresammensetningen varierte mellom algeartene (Fig. 3.12-3.15). *N. oculata* hadde et høyt kvantitativt innhold av PUFA (>50 mg/g TV) ved samtlige veksthastigheter, mens *C. müelleri* inneholdt særlig lite PUFA ved høy veksthastighet. Hos samtlige arter var forholdet (vekt) mellom PUFA og mettede + enumettede fettsyrer i algecellene størst ved 40% av μ_{maks} og avtok når veksthastigheten gikk ned til 4% av μ_{maks} (ikke *C. calcitrans*; Fig. 3.16). Ved 40% av μ_{maks} var forholdet høyest hos *I. galbana* (1,36) og minst hos *C. müelleri* (0,58). En nedgang i innhold av PUFA og økt innhold av mettede og enumettede fettsyrer ved nedgang i veksthastigheten er tidligere rapportert ved fosforbegrenset vekst (Reitan m.fl., 1994b). Dette kan tyde på at algene som ble dyrket semikontinuerlig i storkultur var fosforbegrenset. Ut fra hva som ble funnet hos *C. müelleri* og tidligere rapporter om *Chaetoceros* sp. (Reitan m.fl., 1994b), antas det at også *C. calcitrans* var fosforbegrenset i storkultur.

Med unntak av *I. galbana*, hadde tørrstoff fra algene minst kvantitativt innhold av $\omega 3$ fettsyrer ved høy veksthastighet (60% av μ_{maks} ; Fig. 3.17). Det er tidligere rapportert at også *I. galbana* inneholder minst $\omega 3$ fettsyrer ved høy veksthastighet (Dahle, 1994; Reitan m.fl., 1994). De ulike resultatene kan muligens skyldes ulike lysforhold. Av artene i forsøket var det *N. oculata* som inneholdt mest $\omega 3$ fettsyrer (50,6 mg/g TV ved 60% av μ_{maks}). Den kvantitative mengden $\omega 3$ fettsyrer var forholdsvis liten (mellom 8,7 til 24,0 mg/g TV) i Bacillariophyceae.

Hos *I. galbana* minket kvantitativt innhold av HUFA (DHA (22:6 $\omega 3$), EPA (20:5 $\omega 3$) og AA (20:4 $\omega 6$)) ved nedgang i veksthastighet, mens det økte for de andre algeartene (Fig. 3.19). Lignende tendens er rapportert av Reitan m.fl. (1994b). Av artene som ble dyrket semikontinuerlig, inneholdt *N. oculata* mest EPA. Mengden av denne fettsyren var noe lavere i klassen Bacillariophyceae og manglet nesten helt i *I. galbana*. *I. galbana* hadde derimot desidert størst innhold av DHA, mens *C. müelleri* og *C. calcitrans* kun hadde små mengder og *N. oculata* manglet denne fettsyren. AA ble funnet i samtlige arter, men i svært små mengder hos *C. calcitrans*. Tidligere er det rapportert lignende resultater (Delaunay m.fl., 1993; Reitan m.fl., 1994b; Zhukova og Aizdaicher, 1995).

Relativt (prosent av total fettsyre) innhold av $\omega 3$ fettsyrer var størst ved 40% av μ_{maks} hos samtlige arter (Fig. 3.18). Dette indikerer at enzymene som inngår i desaturering ikke er spesielt påvirket av næringsbegrensning ved 40% av μ_{maks} , og kan også forklare at innholdet av kvantitativt $\omega 3$ fettsyre øker fra 60% til 40% av μ_{maks} . Men som tabell (3.5) viser er den absolutte stigningen for mg/g TV større enn prosent av total fettsyre, og dette tilsier at kun deler av den kvantitative økningen kan relateres til økt relativt innhold. Dette kan bety at enzymer som inngår i celledeling og/eller proteinsyntese er mer påvirket av fosforbegrensning enn desaturasene. Relativt innhold av $\omega 3$ fettsyrer var lavest ved 4% av μ_{maks} , og tidligere er det vist at fosforbegrensning sannsynligvis reduserer syntesen av $\omega 3$ fettsyrer (Reitan m.fl., 1994b). Dette underbygger og støtter antakelsen om at algene som ble dyrket semikontinuerlig i storkultur var fosforbegrenset.

Når veksthastigheten gikk ned, varierte det relative innholdet av HUFA forskjellig hos de ulike algartene (Fig. 3.20). *I. galbana* hadde en jevn nedgang av DHA og AA når veksthastigheten gikk ned. Hos *C. calcitrans*, *C. mülleri* og *N. oculata* økte derimot det relative innholdet av EPA og DHA (ikke *N. oculata*) når veksthastigheten sank til 40% av μ_{maks} , og dette støtter antagelsen om at desaturasene ikke er påvirket av næringsbegrensning ved 40% av μ_{maks} . Videre hadde *N. oculata* og *C. mülleri* en stor relativ nedgang av EPA da veksthastigheten ble endret fra 40% til 4% av μ_{maks} , mens det bare var *I. galbana* som hadde en markert kvalitativ nedgang av AA ($\omega 6$) når veksthastigheten gikk ned til 4% av μ_{maks} . Hos de andre algartene var nivået av AA enten stabilt eller økte med grad av vekstbegrensning. Som nevnt hadde *N. oculata* en relativ nedgang i EPA fra 40% til 4% av μ_{maks} . Forsøk har vist at *Nannochloropsis* sp. har en sterk økning av relativt EPA innhold når den blir dyrket under lysbegrensende forhold (Sukenik og Carmeli, 1989). Dette støtter og understreker antagelsen om at algene i storkultur var næringsbegrenset.

Når veksthastigheten gikk ned fra 60% til 4% av μ_{maks} , hadde algene som ble dyrket i semikontinuerligkultur en økning i relativt innhold av 18:1 ω 9 og 18:2 ω 6, og viste samtidig en nedgang i relativt innhold av 18:3 ω 3 (Vedlegg 5,7,9 og 11). Dette kan bety at 18:1 ω 9 og 18:2 ω 6 er forløpere for de langkjedete $\omega 3$ fettsyrene. 18:1 ω 9 er påstått å være et mellomprodukt i fettsyrebiosyntesen hos Bacillariophyceae (Moreno m.fl., 1979), hvor 18:1 ω 9 er antatt å bli forlenget og desaturert til både $\omega 3$ og $\omega 6$ fettsyrer. Nedsatt biosyntese av

ω 3 fettsyrer, som vist for semikontinuerligkulturene, kan bli resultatet av nedsatt dannelse og aktivitet av enzymet Δ 15 desaturase (Reitan m.fl., 1994b). Ser en vekk fra *I. galbana*, virket det ikke som at syntetiseringen av de langkjedete ω 6 fettsyrene ble påvirket i så stor grad av næringsbegrensning som ω 3 fettsyrene. I samsvar med Reitan m.fl. (1994b) antyder dette at det ikke er Δ 5 og Δ 6 desaturasene som er begrensende for dannelsen av langkjedete ω 3 fettsyrer, men Δ 15 desaturase (Fig. 1.4). Hos *I. galbana* minker også relativt innhold av 20:4 ω 6 med økende næringsbegrensning, og det kan derfor virke som at også Δ 5 desaturase er påvirket av fosforbegrensning hos denne arten.

4.2.3 Karbohydrat:

Mengden av totalt karbohydrat varierte både mellom algeartene og med veksthastigheten til algecellene. Generelt var det Bacillariophyceae som hadde mest karbohydrat, og innholdet lå mellom 10 og 24 prosent av tørrvekten (Fig. 3.21). β -1,3-glucan fulgte det samme mønsteret som totalt karbohydrat, untatt i *N. oculata* hvor innholdet av β -1,3-glucan var lavt i forhold til de andre artene (Fig. 3.22).

Med avtagende veksthastighet var det bare *C. müelleri* (Bacillariophyceae) som hadde en systematisk økning av totalt karbohydratinnhold (Fig. 3.21). Akkumulering av karbohydrat med økt grad av næringsbegrensning er tidligere vist i denne klassen (Myklestad og Haug, 1972; Whyte, 1987; Myklestad, 1989). Som *C. müelleri* inneholdt også *N. oculata* mest karbohydrat ved 4% av μ_{maks} , mens *C. calcitrans* og *I. galbana* rommet mest ved 60% av μ_{maks} . Resultatene antyder altså at hverken *I. galbana* eller *C. calcitrans* akkumulerer karbohydrat med økende vekstbegrensning. Tidligere studier har gitt lignende resultater, men karbohydratinnholdet hos *C. calcitrans* og *I. galbana* ble funnet å være høyere i gjeldende forsøk enn hva som er rapportert av andre (Whyte, 1987; Brown, 1991). Hos *N. oculata* tilsvarte mengden karbohydrat ved 60% av μ_{maks} omtrent det som er rapportert av Brown (1991) og Brown m.fl. (1993). I samsvar med gjeldende forsøk er det også tidligere dokumentert at *N. oculata* rommer mest karbohydrat ved lave veksthastigheter (Brown m.fl., 1993; Sukenik m.fl., 1993).

Ved ulike veksthastigheter viste innholdet av β -1,3-glucan omtrent samme mønster som totalt karbohydrat (Fig. 3.22). Hos *I. galbana*, *C. müelleri* og *C. calcitrans* utgjorde β -1,3-glucan mer enn 40 prosent av totalt karbohydrat uansett veksthastighet, og ved 60% av μ_{maks} utgjorde β -1,3-glucan nesten all karbohydrat i *C. calcitrans*. Resultatene er i overensstemmelse med Whyte (1987). *N. oculata* inneholdt minst andel β -1,3-glucan; under 12 prosent av totalt karbohydrat. Tidligere er det rapportert at *N. oculata* inneholder opptil 70-88 prosent polysakkarid, hvor hoveddelen er glukose (Brown, 1991; Volkmann m.fl., 1993). Både Brown (1991) og Volkmann m.fl. (1993) dyrket *N. oculata* under forhold med 12t lys:mørke, og på samme måte som *S. costatum* kan det tenkes at *N. oculata* er avhengig av diurnalt lysregime for å opprettholde glucanmetabolismen (Vårum m.fl., 1986). I forsøket ble algene dyrket under kontinuerlig belysning, og dette kan forklare at innholdet av β -1,3-glucan var såpass lavt hos *N. oculata*.

4.2.4 Produksjon:

Hos samtlige arter var produksjonen av karbon og lipid størst ved 40% av μ_{maks} (Fig. 3.23 og 3.24). I samsvar med dette har tidligere forsøk vist at produksjonen av karbon er størst rundt 50% av μ_{maks} (Reitan m.fl., 1989; Dahle, 1994). Totalt produserte *C. calcitrans* mest karbon (4,9 g dag⁻¹), mens *I. galbana* produserte mest lipid (2,7 g dag⁻¹). *C. müelleri* hadde en forholdsvis lav maksimal produksjon av lipid i forhold til karbonproduksjon. Dette skyldes at arten inneholder lite lipid ved 40% og 60% av μ_{maks} . *I. galbana* og *C. calcitrans* inneholdt mest karbohydrat ved 60% av μ_{maks} , og dette gjenspeiler seg ved at produksjonen av karbohydrat for disse artene var størst ved 60% av μ_{maks} (Fig. 3.25). Av samtlige arter var det *C. calcitrans* som hadde størst produksjon av karbohydrat (1,89 g dag⁻¹), og av dette var mer enn 95% β -1,3-glucan.

4.3 Valg av mikroalger som fôr til skjell

Innholdet av lipid og karbohydrat i algeceller varierer med art og kultiveringsmetode (Siron m.fl., 1989; Sukenik og Livne, 1991; Sukenik m.fl., 1993; Brown m.fl., 1993; Reitan, m.fl., 1994b; Brown m.fl., 1996). Det er derimot usikkert hvorvidt totalnivået av disse biokjemiske hovedkomponenter er relatert til ernæringskvalitet hos mikroalger. For skjellyngel kan istedet

nivået av spesifikke fettsyrer og sukker være avgjørende for overlevelse (Webb og Chu, 1982; Brown m.fl., 1989; Soudant m.fl., 1998).

Webb og Chu (1982) rapporterte at høy konsentrasjon av lipid, kombinert med enkelte essensielle fettsyrer i algecellene, var relatert i større grad enn protein til bra matkvalitet for bivalve skjellyngel. I samsvar med dette viste forsøk av Enright m.fl. (1986a,b) at total protein var mindre viktig for juvenile østers (*Ostrea edulis* L). Den beste veksten ble her observert ved bruk av dietter med mye karbohydrat, så fremt det samtidig også var høyt nivå av de flerumettede fettsyrene 22:6 ω 3 (DHA) og 20:5 ω 3 (EPA). Senere har Enright m.fl. (1986a,b) fått støtte fra Whyte m.fl. (1989) i sine antagelser om betydningen av karbohydrater i tillegg til HUFA. Whyte m.fl. (1989) fant ut at skjellyngel av *Patinopecten yessoensis* (Jay) hadde høyest næringsinnhold når den var fôret med algedietter som inneholdt mye karbohydrat og PUFA. I motsetning til Whyte m.fl. (1989), har Thompson m.fl. (1994) vist at skjellyngel (*Patinopecten yessoensis* Jay) har størst vekst når den blir fôret med alger som inneholder mye mettede fettsyrer. I tillegg til fettsyrene DHA og EPA har studier også vist at skjellyngel aktivt tar opp langkjedete ω 6 fettsyrer (20:4 ω 6 (AA); Trider og Castell, 1980; Delaunay m.fl., 1993). Som nevnt er karbohydrat en viktig fôrkomponent, og da bivalver inneholder et aktivt laminarase enzym, bør det foretrekkes alger hvor en stor del av karbohydratet utgjøres av β -1,3-glucan (Onishi m.fl., 1985). Sprikende resultater gjør det vanskelig å oppsummere hvilke ernæringsemner som er mest viktig for skjellyngel. Som en følge av dette kan en helgardere slik at skjellyngel fôres med en blanding av algearter som sammen gir et høyt innhold av HUFA, mettede fettsyrer og karbohydrat (β -1,3-glucan). Ut fra tilgjengelig litteratur kan det virke som om proteininnhold bør prioriteres i mindre grad (Brown m.fl., 1989).

Ingen av artene i forsøket hadde høyt innhold av både DHA, EPA, AA, mettede fettsyrer og β -1,3-glucan (Fig. 3.11, Fig. 3.19 og Fig. 3.22). For å dekke ernæringsbehovet hos kamskjell anbefales det derfor å bruke en blanding av artene. En optimal blanding kan være *I. galbana* (60% av μ_{maks}), *C. mülleri* (4% av μ_{maks}) og *N. oculata* (4% av μ_{maks}). Ser en på fettsyrer vil da *I. galbana* gi et stort tilskudd av DHA, *C. mülleri* tilfører mye AA, EPA og mettede fettsyrer, mens *N. oculata* tilfører mye EPA, AA og mettede fettsyrer. Når algene dyrkes ved de angitte veksthastigheter, utgjør tilskuddet av β -1,3-glucan fra *I. galbana* og *C. mülleri* henholdsvis 108,8 mg/g TV og 151,3 mg/g TV. *N. oculata* inneholder svært lite β -1,3-glucan

(12,4 mg/g TV), og ønskes det en diett som er rikere på polysakkaridet, kan *N. oculata* byttes ut med *C. calcitrans* (60% av μ_{maks}). I et slikt tilfelle bør *C. müelleri* dyrkes ved 4% av μ_{maks} , slik at dietten også inneholder mye AA. *C. calcitrans* bør ikke erstatte *I. galbana*, da *I. galbana* er den eneste store kilden til DHA.

5. KONKLUSJON OG PERSPEKTIVER

Ingen av artene bør dyrkes ved temperaturer $> 24^{\circ}\text{C}$, da dette hemmer veksten. For å utnytte vekstpotensialet maksimalt bør *C. calcitrans* og *N. oculata* dyrkes ved 16°C , mens *Tetraselmis* sp., *C. müelleri*, *I. galbana* og *P. lutheri* krever 24°C . *S. costatum* vokser raskest ved 20°C .

Det gikk ikke å dyrke *C. calcitrans* i storkultur uten å klore vannet. Når vannet var klore oppstod det, med unntak av *C. calcitrans*, ingen problemer. *C. calcitrans* ble forsøkt dyrket i klore/avklore vann ved 4% av μ_{maks} , men på grunn av stadige oppblomstringer av ciliaten *Euplotes* sp. ble dette gitt opp. På bakgrunn av resultatene anbefales det ikke å dyrke *C. calcitrans* ved lav veksthastighet.

Veksthastighet og produksjon hos mikroalger viste seg å være avhengig av pH. Ved pH 6 hadde *S. costatum*, *C. calcitrans*, *P. lutheri* og *I. galbana* ingen vekst, mens *C. müelleri*, *Tetraselmis* sp. og *N. oculata* vokste saktere enn ved pH 7,5-8,5. Hos samtlige arter stagnerte algeveksten ved et lavere nivå når det ikke ble tilført CO_2 . Konklusjonen er derfor at kontroll med pH er avgjørende for å ha en høy og stabil produksjon av alger, og ved pulsvis tilsetning av CO_2 må det vises stor forsiktighet i innokuleringsfasen.

Artene som var $>10\mu\text{m}$ hadde større karbon:klorofyll a forhold (vekt) enn artene som var $<10\mu\text{m}$. Dette må det tas hensyn til ved beregning av biomasse fra klorofyll a målinger.

Karboninnholdet til algeceller varierer mellom arter, og med grad av næringsbegrensning. På grunn av dette bør fôringsmengden til kamskjellyngel oppgis som kvantitativ mengde karbon/mikroliter i stedet for antall celler/mikroliter.

Resultatene viste at totallipid, fettsyresammensetning og karbohydratmengde i algene varierer med art og veksthastighet. *C. müelleri* og *N. oculata* lagret karbohydrat og lipid ved økt næringsbegrensning, mens *I. galbana* og *C. calcitrans* kun lagret lipid.

For å kombinere høy produksjon og dyrkbarhet med bra biokjemisk innhold, anbefales det å føre kamskjellyngel med *C. müelleri*, *I. galbana* og *N. oculata* dyrket ved 40% av μ_{maks} . *C.*

mielleri vil da produsere store mengder karbohydrat dag⁻¹, og β -1,3-glucan utgjør en stor del av dette. *I. galbana* vil produsere spesielt mye mettede fettsyrer og DHA (22:6 ω 3), mens *N. oculata* produserer store mengder AA (20:4 ω 6) og EPA (20:5 ω 3).

Tidligere er det vist at *I. galbana* og *C. calcitrans* er bra som fôr til skjellyngel (Le og Rangel, 1985; Delaunay m.fl., 1993; Lu og Blake, 1996), men generelt er det gjort svært lite forskning på fordøyelse til kamskjellyngel. På grunn av dette vet man ikke om den målte biokjemiske sammensetningen i *N. oculata* og *C. mielleri* er representativt for hva skjellyngelen faktisk tar opp. For å oppnå større sikkerhet rundt opptaket fra disse algeartene bør det gjennomføres fôrasjeringsforsøk.

6. LITTERATURLISTE

- Blight, E.G. og Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. og Miller, K.A., 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.*, 32: 64-73.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D. og Leroi, J.M., 1993. The gross aminoacid composition of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5: 285-296.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. og Garland, C.D., 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. CSIRO Mar. Lab. Rep. 205, Australia. 44s.
- Brunet, C., Davoult, D. og Casotti, R., 1996. Physiological reactions to a change in light regime in cultured *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): implications for estimation of phytoplankton biomass. *Hydrobiologia*, 333: 87-94.
- Campell, N.A., 1993. The structure and function of macromolecules. I: Biology. 2. utgave, Benjamin/Cummings Publishing Company, California. s. 64-90.
- Dahle, M.C.K., 1994. Vekst og kjemisk sammensetning hos *Isochrysis galbana* (T. Iso) under næringssaltbegrenst vekst. Hovedfagsoppgave for graden Cand. Scient. Universitetet i Trondheim. s. 17-18.

- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. og Samain, J.-F., 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 173: 163-179.
- Droop, M.R., 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 54: 825-855.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. og Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem., 18: 350-356.
- Duffus, C.M. og Duffus, J.H., 1984. Carbohydrates - structure, location, function. I: Carbohydrate metabolism in plants. Longman Inc., New York. s. 22-40.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. og Castell, J.D., 1986a. Growth of juvenile *Ostrea edulis* fed *Chaetoceros gracilis* of varied chemical composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96: 15-26.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. og Castell, J.D., 1986b. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96: 1-14.
- Flynn, K.J., Davidson, K. og Leftley, J.W., 1993. Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark. J. Appl. Phycol., 5: 465-475.
- Furuya, K., 1990. Subsurface chlorophyll maximum in the tropical and subtropical western Pacific Ocean: vertical profiles of phytoplankton biomass and its relationship with chlorophyll a and particulate organic carbon. Mar. Biol., 107: 529-539.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. og Krieg, N.R., 1994. Chemical analysis. I: Methods for general and molecular bacteriology. 2. utgave, American Society for Microbiology. s. 518-520.

- Gruffydd, L.L.D. og Beaumont, A.R., 1972. A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. Mar. Biol., 15: 350-355.
- Guillard, R.R.L. og Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Gurr, M.I. og Harwood, J.L., 1991. Lipid biochemistry, an introduction. 4. utgave, Chapman and Hall, London og New York. s.1-27.
- Harrison, P.J., Thompson, P.A. og Calderwood, G.S., 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Appl. Phycol., 2: 45-56.
- Haug, A. og Myklestad, S., 1973. Studies on the phytoplankton ecology of the Trondheimsfjord. I: The chemical composition of phytoplankton populations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 11: 15-26.
- Hoek van den, C., Mann, D.G. og Jahns, H.M., 1995. Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press. 627 s.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. og Aaronson, S., 1986. Algal nutrition. I: A. Richmond (Forfatter), Handbook of microalgal mass culture. C. R. C. Press, Florida. s. 147-198.
- Kayama, M., Araki, S. og Sato, S., 1989. Lipids of marine plants. I: R.G. Ackman (forfatter), Marine biogenic lipids, fats and oils. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 2: 3-48.
- Koroleff, F., 1976. Determination of phosphorus. I: K. Grasshoff, M. Ehrhardt og K. Kremling (forfattere), Methods of seawater analysis. 2. utgave, Verlag Chemie, Weinheim, New York. s. 125-136.
- Langdon, C.J. og Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. J. Mar. Biol. Ass., 61: 431-488.

Larsen, R.J. og Marx, M.L., 1986. Power calculations for a two-sample t-test. I: An introduction to mathematical statistics and its applications. Prentice Hall. s. 394-395.

Le Pennec, M. og Rangel-Davlaos, C., 1985. Observations by epifluorescence microscopy of ingestion and digestion of unicellular algae by young larvae of *Pecten maximus*. Aquaculture, 47: 39-51.

Lopez, A.D., Molina, G.E., Sanchez, P.J.A. og Garcia, S.J.L., 1992. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. Aquaculture, 102: 363-371.

Lu, Y.T. og Blake, N.J., 1996. Optimum concentrations of *Isochrysis galbana* for growth of larval and juvenile bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* (Say). J. Shellf. Res., 15: 635-643.

Magnesen, T., 1996. Yngelproduksjon av stort kamskjell. Norsk Fiskeoppdrett, 14a: 24.

Magnesen, T., 1998. Yngelproduksjon av stort kamskjell. I: Marine arter i oppdrett, Norges Forskningsråd, prosjektnr. 112702/120, Scalpro AS. s. 25.

Mauseth, J.D., 1995. Introduction to the principles of chemistry. I: Botany. 2. utgave, Saunders college publishing, USA. s. 36-40.

Metcalf, L.D., Schmitz, A.A. og Pleka, J.R., 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 38: 514-515.

Mikulich, L.V. og Tsikhon-Lukanina, Ye.A., 1981. Food of the scallop. Oceanology, 21: 633-635.

Moffatt N.M., 1981. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom. Rapp. P.-V. Rèun. Cons. Int. Explor. Mer., 178: 475-480.

- Molina, E., Martinez, M.E., Sanchez, S., Garcia, F. og Contreras, A., 1991. Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *Tetraselmis* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 21-25.
- Moreno, V.J., de Moreno, J.E.A. og Brenner, R.R., 1979. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Lipids, 14: 15-19.
- Myklestad, M.S., 1989. Production, chemical Structure, Metabolism, and Biological Function of the (1→3)-Linked, β -D-Glucans in Diatoms. Biol. Ocean., 6: 313-326.
- Myklestad, S. og Haug, A., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I: Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 9: 137-144.
- Nicolas, J.L., Robic, E. og Ansquer, D., 1989. Bacterial flora associated with trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. Aquaculture, 83: 237-248.
- Naas, K.E., Næss, T. og Harboe T., 1992. Enhanced fish feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. Aquaculture, 105: 143-156.
- Odate, T., Yanada, M., Mizuta, H. og Maita, Y., 1993. Phytoplankton carbon biomass estimated from the size-fractionated chlorophyll a concentration and cell density in the Northern coastal waters from spring bloom to summer. Bull. Plankton Soc. Jpn., 39: 127-144.
- Olsen, Y. og Jensen, A., 1989. Utvalg for eutrofieringsforskning. I: Status for NTNFs program for eutrofieringsforskning. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Forskningsråd, Tapir. s. 11-25.
- Onishi, T., Suzuki, M. og Kikuchi, R., 1985. The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish., 51: 301-308.

- Parsons, T.R., Maita, Y. og Lalli, C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 3. utgave, Pergamon Press, Oxford. 171 s.
- Pillay, T.V.R., 1990. Nutrition and feeds. I: Aquaculture. Principles and practises. Great Britain University Press, Cambridge. s. 92-152.
- Pohl, P. og Zurheide, F., 1979. Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. I: H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka (Forfattere), Marine algae in pharmaceutical science. Walter de Gruyter, Berlin, New York, s. 473-523.
- Rainuzzo, J.R., 1988. Studies on the production of high quality rotifers for larvae of marine fish. Hovedfagsoppgave for graden Cand. Scient. Universitetet i Trondheim.
- Reitan, K.I., 1988. Kjemisk sammensetning og næringsverdi av *Skeletonema Costatum* og *Tetraselmis* sp. ved forskjellige dyrkingsbetingelser. Hovedfagsoppgave for graden Cand. Scient. Universitetet i Trondheim.
- Reitan, K.I., 1997. Vekstanlegg for kamskjell. Norges Forskningsråd, prosjektnr. 119230/121. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Trondheim.
- Reitan, K.I., Bolla, S. og Olsen, Y. 1994a. A study of the mechanism of algal uptake in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). J. Fish. Biol., 44: 303-310.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. og Olsen, Y., 1994b. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. J. Phycol., 30: 972-979.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Øie, G. og Olsen, Y., 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Aquaculture, 118:257-275.
- Reitan, K.I., Undheim, M.B. og Olsen, Y., 1989. Produksjonsutbytte og kjemisk sammensetning av mikroalgene *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* og *Tetraselmis* sp. ved forskjellige dyrkingsbetingelser. SINTEF rapport, STF21 A89027, Trondheim.

- Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A. og Sammy, N., 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Sch. Chem. Earth Sci., 3: 43-54.
- Sakshaug, E. og Olsen, Y., 1986. Nutrient status of phytoplankton blooms in Norwegian waters and algal strategies for nutrient competition. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43: 389-396.
- Sakshaug, E., Andresen, K., Myklestad, S. og Olsen, Y., 1983. Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. J. Plankton Res., 5: 175-196.
- Sigaud, T.C.S. og Aidar, E., 1993. Salinity and temperature effects on the growth and chlorophyll-a content of some planktonic algae. Bolm. Inst. Oceanogr., 41: 95-103.
- Siron, R., Giusti, G. og Berland, B., 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* og *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. Mar. Ecol. Prog. Ser., 55: 95-100.
- Soudant, P., Coz, J.R.L., Marty, Y., Moal, J., Robert, R. og Samain, J.F., 1998. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. Comp. Biochem. Physiol., 119: 451-457.
- Strand, Ø. og Mortensen, S., 1995. Kamskjellets biologi. I: Stort kamskjell. Biologi og dyrking. Havforskningsinstituttet, Senter for havbruk, AS Repotrykk Bergen.s. 7-30.
- Strathmann, R.R., 1967. Estimating organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. Limnol. Oceanogr., 12: 411-418.
- Stryer, L., 1995. Fatty acid metabolism. I: Biochemistry. 4. utgave, W. H. Freeman and company, New York, s. 622-624.

- Sukenik, A. og Carmeli, Y., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol., 25: 686-692.
- Sukenik, A. og Livne, A., 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine prymnesiophyta *Isochrysis galbana*. Plant Cell Physiol., 32: 371-378.
- Sukenik, A., Zmora, O. og Carmeli, Y., 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture, 117: 313-326.
- Sæther, S.A., 1998. Statistiske metoder. 5. utgave, Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Trondheim. 69s.
- Thompson, P.A., Guo, M. og Harrison, P.J., 1994. Influence of irradiance on the nutritional value of two phytoplankton species fed to larval Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*). Inst. Ocean Sci., 119: 89-97.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. og Harrison, P.J., 1992. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. Inst. Ocean Sci., 28: 481-488.
- Trider, D.J. og Castell, J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). J. Nutr., 110: 1303-1309.
- Tytler, P., Ireland, J. og Murray, L., 1997. A study of the assimilation of fluorescent pigments of microalgae *Isochrysis galbana* by the early larval stages of turbot and herring. J. Fish. Biol., 50: 999-1009.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A. og Jeffrey, S.W., 1993. The biochemical composition of marine mikroalgae from the class Eustigmatophyceae. J. Phycol., 29: 69-78.

Vårum, K.M., Østgaard, K. og Grimsrud, K., 1986. Diurnal rhythms in carbohydrate metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 102: 249-256.

Webb, K.L og Chu, F.L.E., 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. I: G. D. Pruder, C.J. Langdon og D.E. Conlin (forfattere). Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Louisiana state university press, Baton Rouge, LA. s. 272-291.

Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical Composition and Energy Content of Six Species of Phytoplankton used in Mariculture of Bivalves. Aquaculture, 60:231-241.

Whyte, J.N.C., Bourne, N. og Hodgson, C.A., 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. Aquaculture, 78: 333-348.

Yantian, L.T. og Norman, B.J., 1996. Optimum concentration of *Isochrysis galbana* for growth of larva and juvenile bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* (Say). J. Shellf. Res. 15: 635-643.

Zhukova, N.V. og Aizdaicher, N.A., 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine mikroalgae. Phytochemistry, 39: 351-356.

Lugols fytofiksløsning:

Ionebyttet vann (200 ml)
Iseddik 99-100% (20 ml)
Kaliumjodid (KI; 20 g)
Jod (I₂; 10 G)

1. Tilsett iseddik til vannet.
2. Løs opp kaliumjodid.
3. Løs opp jod. Må røres en god stund, da jod er tungtløselig.

VEDLEGG 2

Reagenser til fosfatanalyse:

Svovelsyre 9 N (antall mol H⁺/liter) (4,5 molar):

I en 1000 ml målekolbe tilsettes 250 ml konsentrert svovelsyre til 750 ml ionebyttet vann. (Hell syra i vannet, ikke motsatt!). Lagres i polypropylenflaske.

Kalium persulfatløsning:

5 ml svovelsyre (9 N).

Blandes i 95 ml ionebyttet vann (Hell syra i vannet, ikke motsatt!).

Tilsett og løs 5 gram kaliumperoxodisulfat (K₂S₂O₈), rist.

Stabilt omtrent 1 uke, lagres mørkt i polyethylenflaske.

Askorbinsyremiks:

10 gram askorbinsyre (C₆H₈O₆) løses i 50 ml vann.

Tilsett 50 ml svovelsyre (9 N).

Stabilt i uker, kan brukes så lenge det er fargeløst. Lagres i kjøleskap på glass.

Mikset reagens:

Løs 12,5 gram ammoniumheptamolybdattetrahydrat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O) i 125 ml ionebyttet vann.

Løs også 0,5 gram kaliumantimonyttrate (K(SbO)C₄H₄O₆, med eller uten ½ H₂O) i 20 ml ionebyttet vann.

Tilsett molybdatløsningen til 350 ml svovelsyre (9 N), rør kontinuerlig. Ha i ttrate løsningen og bland godt. Lagres på glassflaske.

Fosfat standardløsning:

Kaliumdihydrogenfosfat (KH₂PO₄) tørkes i ovn ved 110°C i 24 timer.

Ionebyttet vann, som har blitt tilsatt 0,2 ml svovelsyre (9 N), blandes med nøyaktig 136,1 mg KH₂PO₄.

Tynn ut til 1 dl med ionebyttet vann.

Standardløsninger inneholder 10 µmol PO₄³⁻/ml.

Reagenser til karbohydratanalyse:

Total karbohydrat:

Standard glukoseløsning:

100 mg glukose tørkes ved 103°C i 24 timer og løses i 100 ml 0,15% benzosyre. Lagret ved 5°C er løsningen stabil i flere måneder. Før bruk fortynnes løsningen 1:10 i ionebyttet vann. Dette gir en løsning som inneholder 100 µg glukose/ml.

Fenol løsning:

Løs 5 g reagentgradert fenol i 100 ml ionebyttet vann

β-1,3-glucan:

Svovelsyre 0,1 N:

Til 89 ml ionebyttet vann tilsettes 1 ml 9 N svovelsyre.

VEDLEGG 4

Lipid- og fettsyresammensetning (mg/g tørrvekt) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>C. calcitrans</i> 40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	<i>C. calcitrans</i> 60 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV
	A1	A2			A3	A4		
Prøve								
mg/g TV								
14:0	7,3	6,8	7,1	0,4	4,4	4,3	4,4	0,1
16:0	7,9	7,8	7,9	0,1	6,7	6,9	6,8	0,1
18:0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0
20:0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
22:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
16:1	2,7	24,2	13,5	15,2	15,8	14,4	15,1	1,0
18:1n-9	0,4	0,3	0,4	0,1	0,3	0,4	0,4	0,1
18:1n-7	0,9	0,9	0,9	0,0	0,9	0,9	0,9	0,0
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
16:2n-4	3,0	2,8	2,9	0,1	1,9	1,9	1,9	0,0
16:3n-4	9,5	9,1	9,3	0,3	5,3	5,4	5,4	0,1
16:4	1,4	1,3	1,4	0,1	1,3	1,4	1,4	0,1
18:2n-6	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0
18:3n-6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
20:2n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4n-6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
18:3n-3	0,4	0,4	0,4	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0
18:4n-3	1,1	1,1	1,1	0,0	0,9	0,9	0,9	0,0
20:4n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,2
20:5n-3	20,7	20,2	20,5	0,4	12,3	12,7	12,5	0,3
22:5n-3	0,0	1,3	0,7	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6n-3	1,4	1,3	1,4	0,1	0,8	1,0	0,9	0,1
Sum sat	15,4	15,0	15,2	0,3	11,4	11,5	11,5	0,1
Sum mono	4,0	25,4	14,7	15,1	17,0	15,8	16,4	0,8
Sum poly	37,9	37,9	37,9	0,0	23,0	24,2	23,6	0,8
Sum n-6	0,4	0,4	0,4	0,0	0,3	0,4	0,4	0,1
Sum n-3	23,6	24,3	24,0	0,5	14,2	15,1	14,7	0,6
Hufa n-3	22,1	22,8	22,5	0,5	13,1	14,0	13,6	0,6
n-3/n-6	59,0	60,8	59,9	1,2	47,3	37,8	42,5	6,8
DHA/EPA	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
non Hufa n-3	1,5	1,5	1,5	0,0	1,1	1,1	1,1	0,0
totalt lipid	168,3	166,3	167,3	1,4	120,3	117,2	118,8	2,2
Sum FS	57,3	78,3	67,8	14,8	51,4	51,5	51,5	0,1
FS/totalt lipid	0,3	0,5	0,4	0,1	0,4	0,4	0,4	0,0

VEDLEGG 5

Lipid- og fettsyresammensetning (% av total fettsyre) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>C. calcitrans</i>				<i>C. calcitrans</i>			
	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV
Prøve	A1	A2			A3	A4		
% av sum FS								
14:0	12,740	8,685	10,7	2,9	8,560	8,350	8,5	0,1
16:0	13,787	9,962	11,9	2,7	13,035	13,398	13,2	0,3
18:0	0,349	0,255	0,3	0,1	0,389	0,388	0,4	0,0
20:0	0,000	0,255	0,1	0,2	0,000	0,194	0,1	0,1
22:0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,195	0,000	0,1	0,1
16:1	4,712	30,907	17,8	18,5	30,739	27,961	29,4	2,0
18:1n-9	0,698	0,383	0,5	0,2	0,584	0,777	0,7	0,1
18:1n-7	1,571	1,149	1,4	0,3	1,751	1,748	1,7	0,0
20:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
22:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,194	0,1	0,1
16:2n-4	5,236	3,576	4,4	1,2	3,696	3,689	3,7	0,0
16:3n-4	16,579	11,622	14,1	3,5	10,311	10,485	10,4	0,1
16:4	2,443	1,660	2,1	0,6	2,529	2,718	2,6	0,1
18:2n-6	0,349	0,255	0,3	0,1	0,389	0,388	0,4	0,0
18:3n-6	0,175	0,128	0,2	0,0	0,000	0,194	0,1	0,1
20:2n-6	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
20:3n-6	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
20:4n-6	0,175	0,128	0,2	0,0	0,195	0,194	0,2	0,0
18:3n-3	0,698	0,511	0,6	0,1	0,389	0,388	0,4	0,0
18:4n-3	1,920	1,405	1,7	0,4	1,751	1,748	1,7	0,0
20:4n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,583	0,3	0,4
20:5n-3	36,126	25,798	31,0	7,3	23,930	24,660	24,3	0,5
22:5n-3	0,000	1,660	0,8	1,2	0,000	0,000	0,0	0,0
22:6n-3	2,443	1,660	2,1	0,6	1,556	1,942	1,7	0,3
Sum sat	26,9	19,2	23,0	5,5	22,2	22,3	22,3	0,1
Sum mono	7,0	32,4	19,7	18,0	33,1	30,7	31,9	1,7
Sum poly	66,1	48,4	57,3	12,5	44,7	47,0	45,9	1,6
Sum n-6	0,7	0,5	0,6	0,1	0,6	0,8	0,7	0,1
Sum n-3	41,2	31,0	36,1	7,2	27,6	29,3	28,5	1,2
Hufa n-3	38,6	29,1	33,8	6,7	25,5	27,2	26,3	1,2
non Hufa n-3	2,6	1,9	2,3	0,5	2,1	2,1	2,1	0,0
Sum FS	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0

VEDLEGG 6

Lipid- og fettsyresammensetning (mg/g tørrvekt) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>C. müelleri</i>				<i>C. müelleri</i>				<i>C. müelleri</i>	
	4 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}	
	A1	A2			A3	A4			A5	
Prøve mg/g TV										
14:0	10,9	12,7	11,8	1,3	5,2	4,3	4,8	0,6	3,2	
16:0	32,0	38,3	35,2	4,5	12,7	9,9	11,3	2,0	8,9	
18:0	2,6	2,6	2,6	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,6	
20:0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	
22:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
16:1	39,4	45,8	42,6	4,5	16,7	13,4	15,1	2,3	15,0	
18:1n-9	1,2	1,2	1,2	0,0	0,4	0,4	0,4	0,0	0,3	
18:1n-7	2,6	2,6	2,6	0,0	0,5	0,5	0,5	0,0	0,3	
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
22:1	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	
16:2n-4	5,8	3,4	4,6	1,7	3,2	1,0	2,1	1,6	0,8	
16:3n-4	0,5	0,0	0,3	0,4	0,1	3,2	1,7	2,2	2,6	
16:4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	
18:2n-6	1,2	1,2	1,2	0,0	0,4	0,4	0,4	0,0	0,4	
18:3n-6	2,9	2,9	2,9	0,0	1,3	1,3	1,3	0,0	0,9	
20:2n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
20:3n-6	0,5	0,5	0,5	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	
20:4n-6	14,8	15,2	15,0	0,3	2,2	2,4	2,3	0,1	2,6	
18:3n-3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	
18:4n-3	0,7	0,7	0,7	0,0	0,8	0,8	0,8	0,0	0,4	
20:4n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	
20:5n-3	16,5	16,5	16,5	0,0	9,0	9,1	9,1	0,1	7,4	
22:5n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
22:6n-3	2,2	2,1	2,2	0,1	1,3	1,2	1,3	0,1	0,9	
Sum sat	45,7	53,8	49,8	5,7	19,0	15,3	17,2	2,6	12,7	
Sum mono	43,7	50,1	46,9	4,5	17,6	14,4	16,0	2,3	15,6	
Sum poly	45,4	42,9	44,2	1,8	18,6	19,8	19,2	0,8	16,2	
Sum n-6	19,4	19,8	19,6	0,3	4,0	4,2	4,1	0,1	4,0	
Sum n-3	19,6	19,5	19,6	0,1	11,3	11,3	11,3	0,0	8,7	
Hufa n-3	18,7	18,6	18,7	0,1	10,4	10,4	10,4	0,0	8,3	
n-3/n-6	1,0	1,0	1,0	0,0	2,8	2,7	2,8	0,1	2,2	
DHA/EPA	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	
non Hufa n-3	0,9	0,9	0,9	0,0	0,9	0,9	0,9	0,0	0,4	
totalt lipid	313,1	313,7	313,4	0,4	125,1	123,0	124,1	1,5	106,8	
Sum FS	134,8	146,8	140,8	8,5	55,2	49,5	52,4	4,0	44,5	
FS/totalt lipid	0,4	0,5	0,4	0,0	0,4	0,4	0,4	0,0	0,4	

VEDLEGG 7

Lipid- og fettsyresammensetning (% av total fettsyre) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>C. müelleri</i>				<i>C. müelleri</i>				<i>C. müelleri</i>
	4 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}
	A1	A2			A3	A4			A5
Prøve % av sum FS									
14:0	8,086	8,651	8,4	0,4	9,420	8,687	9,1	0,5	7,191
16:0	23,739	26,090	24,9	1,7	23,007	20,000	21,5	2,1	20,000
18:0	1,929	1,771	1,8	0,1	1,812	2,020	1,9	0,1	1,348
20:0	0,148	0,136	0,1	0,0	0,181	0,202	0,2	0,0	0,000
22:0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000
16:1	29,228	31,199	30,2	1,4	30,254	27,071	28,7	2,3	33,708
18:1n-9	0,890	0,817	0,9	0,1	0,725	0,808	0,8	0,1	0,674
18:1n-7	1,929	1,771	1,8	0,1	0,906	1,010	1,0	0,1	0,674
20:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000
22:1	0,371	0,341	0,4	0,0	0,000	0,202	0,1	0,1	0,000
16:2n-4	4,303	2,316	3,3	1,4	5,797	2,020	3,9	2,7	1,798
16:3n-4	0,371	0,000	0,2	0,3	0,181	6,465	3,3	4,4	5,843
16:4	0,074	0,136	0,1	0,0	0,000	0,202	0,1	0,1	0,225
18:2n-6	0,890	0,817	0,9	0,1	0,725	0,808	0,8	0,1	0,899
18:3n-6	2,151	1,975	2,1	0,1	2,355	2,626	2,5	0,2	2,022
20:2n-6	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000
20:3n-6	0,371	0,341	0,4	0,0	0,181	0,202	0,2	0,0	0,225
20:4n-6	10,979	10,354	10,7	0,4	3,986	4,848	4,4	0,6	5,843
18:3n-3	0,148	0,136	0,1	0,0	0,181	0,202	0,2	0,0	0,000
18:4n-3	0,519	0,477	0,5	0,0	1,449	1,616	1,5	0,1	0,899
20:4n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,181	0,202	0,2	0,0	0,000
20:5n-3	12,240	11,240	11,7	0,7	16,304	18,384	17,3	1,5	16,629
22:5n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000
22:6n-3	1,632	1,431	1,5	0,1	2,355	2,424	2,4	0,0	2,022
Sum sat	33,9	36,6	35,3	1,9	34,4	30,9	32,7	2,5	28,5
Sum mono	32,4	34,1	33,3	1,2	31,9	29,1	30,5	2,0	35,1
Sum poly	33,7	29,2	31,5	3,2	33,7	40,0	36,8	4,5	36,4
Sum n-6	14,4	13,5	13,9	0,6	7,2	8,5	7,9	0,9	9,0
Sum n-3	14,5	13,3	13,9	0,9	20,5	22,8	21,6	1,7	19,6
Hufa n-3	13,9	12,7	13,3	0,9	18,8	21,0	19,9	1,5	18,7
non Hufa n-3	0,7	0,6	0,6	0,0	1,6	1,8	1,7	0,1	0,9
Sum FS	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0

VEDLEGG 8

Lipid- og fettsyresammensetning (mg/g tørrvekt) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>I. galbana</i>				<i>I. galbana</i>				<i>I. galbana</i>			
	4 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV
	A1	A2			A3	A4			A5	A6		
Prøve												
mg/g TV												
14:0	18,2	13,7	16,0	3,2	12,3	12,0	12,2	0,2	10,5	8,8	9,7	1,2
16:0	1,4	1,3	1,4	0,1	1,1	8,0	4,6	4,9	7,4	7,5	7,5	0,1
18:0	0,1	0,2	0,2	0,1	7,8	0,2	4,0	5,4	0,3	0,3	0,3	0,0
20:0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
22:0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:1	14,3	14,0	14,2	0,2	8,1	6,6	7,4	1,1	2,9	3,5	3,2	0,4
18:1n-9	12,0	12,2	12,1	0,1	1,5	7,8	4,7	4,5	8,3	8,3	8,3	0,0
18:1n-7	2,2	2,0	2,1	0,1	0,1	1,8	1,0	1,2	1,1	1,2	1,2	0,1
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:2n-4	0,6	0,6	0,6	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,6	0,6	0,6	0,0
16:3n-4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
16:4	0,9	0,9	0,9	0,0	0,0	1,1	0,6	0,8	0,6	0,7	0,7	0,1
18:2n-6	15,2	16,0	15,6	0,6	3,5	3,5	3,5	0,0	2,3	2,3	2,3	0,0
18:3n-6	0,9	0,9	0,9	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
20:2n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
20:3n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
20:4n-6	1,3	1,5	1,4	0,1	1,9	1,9	1,9	0,0	2,8	2,7	2,8	0,1
18:3n-3	8,3	8,5	8,4	0,1	7,2	7,4	7,3	0,1	4,0	4,0	4,0	0,0
18:4n-3	10,0	10,3	10,2	0,2	16,7	16,5	16,6	0,1	11,9	12,0	12,0	0,1
20:4n-3	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n-3	0,4	0,5	0,5	0,1	0,7	0,7	0,7	0,0	0,2	0,6	0,4	0,3
22:5n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
22:6n-3	9,9	11,6	10,8	1,2	14,0	13,6	13,8	0,3	15,2	15,6	15,4	0,3
Sum sat	19,8	15,3	17,6	3,2	21,3	20,3	20,8	0,7	18,3	16,7	17,5	1,1
Sum mono	28,5	28,2	28,4	0,2	9,7	16,3	13,0	4,7	12,3	13,0	12,7	0,5
Sum poly	47,5	51,0	49,3	2,5	45,3	46,2	45,8	0,6	37,9	38,9	38,4	0,7
Sum n-6	17,4	18,4	17,9	0,7	5,7	5,7	5,7	0,0	5,3	5,2	5,3	0,1
Sum n-3	28,6	31,1	29,9	1,8	38,6	38,3	38,5	0,2	31,3	32,3	31,8	0,7
Hufa n-3	10,3	12,3	11,3	1,4	14,7	14,4	14,6	0,2	15,4	16,3	15,9	0,6
n-3/n-6	1,6	1,7	1,7	0,0	6,8	6,7	6,7	0,0	5,9	6,2	6,1	0,2
DHA/EPA	24,8	23,2	24,0	1,1	20,0	19,4	19,7	0,4	76,0	26,0	51,0	35,4
non Hufa n-3	18,3	18,8	18,6	0,4	23,9	23,9	23,9	0,0	15,9	16,0	16,0	0,1
totalt lipid	292,9	286,3	289,6	4,7	250,1	250,0	250,1	0,1	223,0	222,2	222,6	0,6
Sum FS	95,8	94,5	95,2	0,9	76,3	82,8	79,6	4,6	68,5	68,6	68,6	0,1
FS/totalt lipid	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0

VEDLEGG 9

Lipid- og fettsyresammensetning (% av total fettsyre) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>I. galbana</i>				<i>I. galbana</i>				<i>I. galbana</i>			
	4 % av μ_{maks}		Snitt STDAV		40 % av μ_{maks}		Snitt STDAV		60 % av μ_{maks}		Snitt STDAV	
	A1	A2			A3	A4			A5	A6		
Prøve												
% av sum FS												
14:0	18,998	14,497	16,7	3,2	16,121	14,493	15,3	1,2	15,328	12,828	14,1	1,8
16:0	1,461	1,376	1,4	0,1	1,442	9,662	5,6	5,8	10,803	10,933	10,9	0,1
18:0	0,104	0,212	0,2	0,1	10,223	0,242	5,2	7,1	0,438	0,437	0,4	0,0
20:0	0,104	0,000	0,1	0,1	0,131	0,121	0,1	0,0	0,146	0,146	0,1	0,0
22:0	0,000	0,106	0,1	0,1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
16:1	14,927	14,815	14,9	0,1	10,616	7,971	9,3	1,9	4,234	5,102	4,7	0,6
18:1n-9	12,526	12,910	12,7	0,3	1,966	9,420	5,7	5,3	12,117	12,099	12,1	0,0
18:1n-7	2,296	2,116	2,2	0,1	0,131	2,174	1,2	1,4	1,606	1,749	1,7	0,1
20:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,121	0,1	0,1	0,000	0,000	0,0	0,0
22:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
16:2n-4	0,626	0,635	0,6	0,0	1,311	1,208	1,3	0,1	0,876	0,875	0,9	0,0
16:3n-4	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,121	0,1	0,1	0,146	0,146	0,1	0,0
16:4	0,939	0,952	0,9	0,0	0,000	1,329	0,7	0,9	0,876	1,020	0,9	0,1
18:2n-6	15,866	16,931	16,4	0,8	4,587	4,227	4,4	0,3	3,358	3,353	3,4	0,0
18:3n-6	0,939	0,952	0,9	0,0	0,393	0,362	0,4	0,0	0,146	0,146	0,1	0,0
20:2n-6	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,146	0,1	0,1
20:3n-6	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,146	0,000	0,1	0,1
20:4n-6	1,357	1,587	1,5	0,2	2,490	2,295	2,4	0,1	4,088	3,936	4,0	0,1
18:3n-3	8,664	8,995	8,8	0,2	9,436	8,937	9,2	0,4	5,839	5,831	5,8	0,0
18:4n-3	10,438	10,899	10,7	0,3	21,887	19,928	20,9	1,4	17,372	17,493	17,4	0,1
20:4n-3	0,000	0,212	0,1	0,1	0,000	0,121	0,1	0,1	0,000	0,000	0,0	0,0
20:5n-3	0,418	0,529	0,5	0,1	0,917	0,845	0,9	0,1	0,292	0,875	0,6	0,4
22:5n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,146	0,1	0,1
22:6n-3	10,334	12,275	11,3	1,4	18,349	16,425	17,4	1,4	22,190	22,741	22,5	0,4
Sum sat	20,7	16,2	18,4	3,2	27,9	24,5	26,2	2,4	26,7	24,3	25,5	1,7
Sum mono	29,7	29,8	29,8	0,1	12,7	19,7	16,2	4,9	18,0	19,0	18,5	0,7
Sum poly	49,6	54,0	51,8	3,1	59,4	55,8	57,6	2,5	55,3	56,7	56,0	1,0
Sum n-6	18,2	19,5	18,8	0,9	7,5	6,9	7,2	0,4	7,7	7,6	7,7	0,1
Sum n-3	29,9	32,9	31,4	2,2	50,6	46,3	48,4	3,1	45,7	47,1	46,4	1,0
Hufa n-3	10,8	13,0	11,9	1,6	19,3	17,4	18,3	1,3	22,5	23,8	23,1	0,9
non Hufa n-3	19,1	19,9	19,5	0,6	31,3	28,9	30,1	1,7	23,2	23,3	23,3	0,1
Sum FS	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0

VEDLEGG 10

Lipid- og fettsyresammensetning (mg/g tørrvekt) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>N. oculata</i>				<i>N. oculata</i>				<i>N. oculata</i>			
	4 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV
	A1	A2			A3	A4			A5	A6		
Prøve												
mg/g TV												
14:0	11,0	9,7	10,4	0,9	5,4	5,6	5,5	0,1	5,7	5,4	5,6	0,2
16:0	41,6	29,5	35,6	8,6	19,3	18,5	18,9	0,6	19,2	15,2	17,2	2,8
18:0	0,9	0,9	0,9	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1
20:0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:1	41,2	31,4	36,3	6,9	28,1	25,0	26,6	2,2	26,9	20,8	23,9	4,3
18:1n-9	9,3	9,7	9,5	0,3	1,5	1,5	1,5	0,0	2,5	2,0	2,3	0,4
18:1n-7	1,2	1,6	1,4	0,3	0,8	0,7	0,8	0,1	0,8	0,5	0,7	0,2
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:2n-4	0,6	0,6	0,6	0,0	1,2	1,1	1,2	0,1	0,2	1,5	0,9	0,9
16:3n-4	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1
16:4	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,2	0,1
18:2n-6	4,6	5,0	4,8	0,3	2,1	2,1	2,1	0,0	3,2	3,0	3,1	0,1
18:3n-6	0,9	0,9	0,9	0,0	0,7	0,7	0,7	0,0	0,5	0,5	0,5	0,0
20:2n-6	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3n-6	2,5	2,8	2,7	0,2	0,5	0,4	0,5	0,1	0,3	0,3	0,3	0,0
20:4n-6	10,5	12,1	11,3	1,1	8,5	8,4	8,5	0,1	6,2	5,9	6,1	0,2
18:3n-3	0,8	0,9	0,9	0,1	1,1	1,0	1,1	0,1	1,0	1,0	1,0	0,0
18:4n-3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,2
20:4n-3	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n-3	50,6	48,6	49,6	1,4	48,9	47,4	48,2	1,1	41,8	34,9	38,4	4,9
22:5n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sum sat	53,5	40,2	46,9	9,4	24,9	24,3	24,6	0,4	25,2	20,8	23,0	3,1
Sum mono	51,7	42,7	47,2	6,4	30,4	27,2	28,8	2,3	30,2	23,3	26,8	4,9
Sum poly	71,1	71,7	71,4	0,4	63,4	61,5	62,5	1,3	53,6	47,8	50,7	4,1
Sum n-6	18,5	20,9	19,7	1,7	11,8	11,6	11,7	0,1	10,2	9,7	10,0	0,4
Sum n-3	51,4	49,8	50,6	1,1	50,1	48,5	49,3	1,1	42,8	36,2	39,5	4,7
Hufa n-3	50,6	48,8	49,7	1,3	48,9	47,4	48,2	1,1	41,8	34,9	38,4	4,9
n-3/n-6	2,8	2,4	2,6	0,3	4,2	4,2	4,2	0,0	4,2	3,7	4,0	0,3
DHA/EPA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
non Hufa n-3	0,8	1,0	0,9	0,1	1,2	1,1	1,2	0,1	1,0	1,3	1,2	0,2
totalt lipid	326,6	343,6	335,1	12,0	271,8	270,3	271,1	1,1	234,9	240,9	237,9	4,2
Sum FS	176,3	154,6	165,5	15,3	118,7	113,0	115,9	4,0	109,0	91,9	100,5	12,1
FS/totalt lipid	0,5	0,4	0,5	0,1	0,4	0,4	0,4	0,0	0,5	0,4	0,4	0,1

VEDLEGG 11

Lipid- og fettsyresammensetning (% av total fettsyre) i semikontinuerligkultur.

Art	<i>N. oculata</i>				<i>N. oculata</i>				<i>N. oculata</i>			
	4 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	40 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV	60 % av μ_{maks}		Snitt	STDAV
	A1	A2			A3	A4			A5	A6		
Prøve												
% av sum FS												
14:0	6,239	6,274	6,3	0,0	4,549	4,956	4,8	0,3	5,229	5,876	5,553	0,5
16:0	23,596	19,082	21,3	3,2	16,259	16,372	16,3	0,1	17,615	16,540	17,077	0,8
18:0	0,510	0,582	0,5	0,1	0,168	0,177	0,2	0,0	0,275	0,218	0,246	0,0
20:0	0,000	0,065	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
22:0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
16:1	23,369	20,310	21,8	2,2	23,673	22,124	22,9	1,1	24,679	22,633	23,656	1,4
18:1n-9	5,275	6,274	5,8	0,7	1,264	1,327	1,3	0,0	2,294	2,176	2,235	0,1
18:1n-7	0,681	1,035	0,9	0,3	0,674	0,619	0,6	0,0	0,734	0,544	0,639	0,1
20:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
22:1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
16:2n-4	0,340	0,388	0,4	0,0	1,011	0,973	1,0	0,0	0,183	1,632	0,908	1,0
16:3n-4	0,113	0,129	0,1	0,0	0,084	0,088	0,1	0,0	0,275	0,218	0,246	0,0
16:4	0,227	0,129	0,2	0,1	0,168	0,177	0,2	0,0	0,092	0,218	0,155	0,1
18:2n-6	2,609	3,234	2,9	0,4	1,769	1,858	1,8	0,1	2,936	3,264	3,100	0,2
18:3n-6	0,510	0,582	0,5	0,1	0,590	0,619	0,6	0,0	0,459	0,544	0,501	0,1
20:2n-6	0,000	0,065	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
20:3n-6	1,418	1,811	1,6	0,3	0,421	0,354	0,4	0,0	0,275	0,326	0,301	0,0
20:4n-6	5,956	7,827	6,9	1,3	7,161	7,434	7,3	0,2	5,688	6,420	6,054	0,5
18:3n-3	0,454	0,582	0,5	0,1	0,927	0,885	0,9	0,0	0,917	1,088	1,003	0,1
18:4n-3	0,000	0,065	0,0	0,0	0,084	0,088	0,1	0,0	0,000	0,326	0,163	0,2
20:4n-3	0,000	0,129	0,1	0,1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
20:5n-3	28,701	31,436	30,1	1,9	41,196	41,947	41,6	0,5	38,349	37,976	38,162	0,3
22:5n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
22:6n-3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
Sum sat	30,3	26,0	28,2	3,1	21,0	21,5	21,2	0,4	23,1	22,6	22,9	0,3
Sum mono	29,3	27,6	28,5	1,2	25,6	24,1	24,8	1,1	27,7	25,4	26,5	1,7
Sum poly	40,3	46,4	43,4	4,3	53,4	54,4	53,9	0,7	49,2	52,0	50,6	2,0
Sum n-6	10,5	13,5	12,0	2,1	9,9	10,3	10,1	0,2	9,4	10,6	10,0	0,8
Sum n-3	29,2	32,2	30,7	2,2	42,2	42,9	42,6	0,5	39,3	39,4	39,3	0,1
Hufa n-3	28,7	31,6	30,1	2,0	41,2	41,9	41,6	0,5	38,3	38,0	38,2	0,3
non Hufa n-3	0,5	0,6	0,6	0,1	1,0	1,0	1,0	0,0	0,9	1,4	1,2	0,4
Sum FS	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0

VEDLEGG 12

Absorbans (OD_{750}) ved høsting av semikontinuerligkultur:

% av μ_{maks}	<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>	<i>C. müelleri</i>	<i>C. calcitrans</i>
4	0,71	0,95	0,51	
40	0,38	0,43	0,24	0,35
60	0,19	0,23	0,18	0,17

VEDLEGG 13

Produksjon av lipid for *I. galbana* ved 4% av μ_{maks} :

OD_{750} ved høsting = 0,71

$$C(\text{mg l}^{-1}) = 133,55 \cdot (OD_{750}) - 2,8055 = \underline{90,6795 \text{ mg C l}^{-1}} \quad (\text{Tabell 3.1})$$

$$\text{Produksjon av karbon} = \Delta V * \text{mg C l}^{-1} = 11 \text{ l} * 90,6795 \text{ mg C l}^{-1} = \underline{997,4745 \text{ mg C}}$$

$$\text{Tørrvekt (TV)} = 2,62 * \text{karbon}$$

$$\text{Produksjon av TV} = 2,62 * 997,4745 = \underline{2,613383 \text{ g TV}}$$

Ved 4% av μ_{maks} utgjør totallipid 0,2896 g lipid $\text{g}^{-1}\text{TV}^{-1}$

Daglig produksjon av lipid blir:

$$2,613383 \text{ g TV} * 0,2896 \text{ g lipid g}^{-1}\text{TV}^{-1} = \underline{0,7568 \text{ g lipid}}$$

Lignende fremgangsmåte ble brukt for karbohydrat.

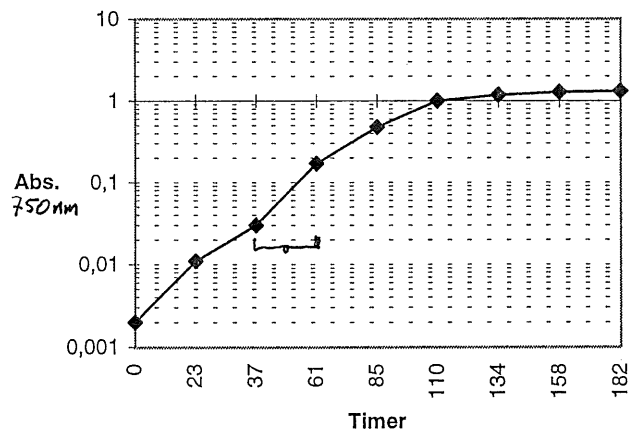
VEDLEGG 14

Beregning av μ_{maks} :

Timer	OD ₇₅₀
0	0,002
23	0,011
37	0,03
61	0,17
85	0,475
110	1,0
134	1,175
158	1,273
182	1,302

$$\mu_{\text{maks}} \text{ dag}^{-1} = (\ln 0,17 - \ln 0,03)/24 * 24 = \underline{1,73}$$

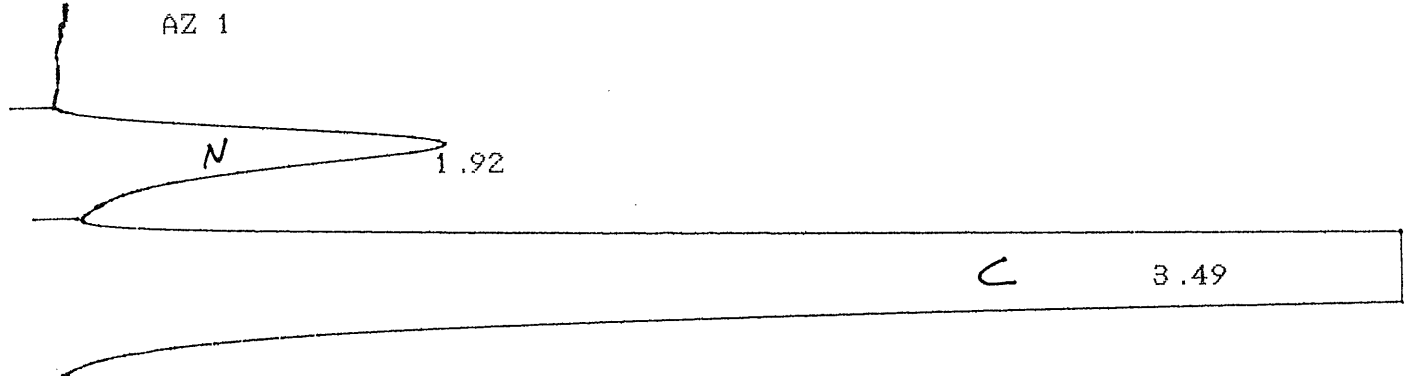
I. galbana, 24 °C



VEDLEGG 15

Karbon og nitrogen:

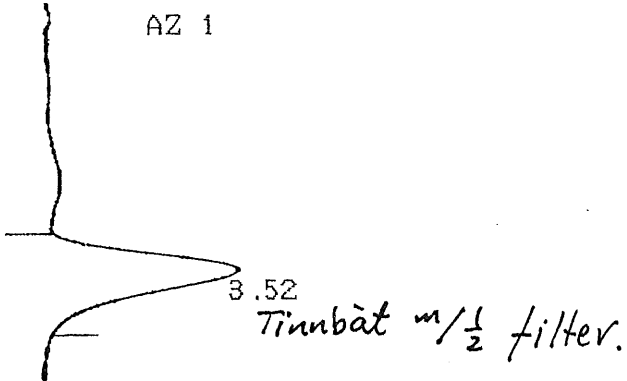
CHANNEL A INJECT 44-01-00 01:04:21 STORED TO BIN # 126



ER 0
DATA SAVED TO BIN # 126

BJOERN		44-01-00 01:04:21	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 126	INDEX 126	BIN 126
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	4.756	1.92	21152 02	<i>Nitrogen</i>
2	95.244	3.49	423594 03	<i>Karbon</i>
TOTAL	100.		444746	

CHANNEL A INJECT 44-01-00 01:28:21 STORED TO BIN # 2



ER 0
DATA SAVED TO BIN # 2

BJOERN		44-01-00 01:28:21	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 130	INDEX 130	BIN 2
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	3.52	9169 01	
TOTAL	100.		9169	