

Bruk av selektiv dyrkningsstrategi for å øke spesifikt lipidinnhold i mikroalger, for produksjon av biodiesel

Ruben Mathias Sæther

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: juni 2013

Hovedveileder: Olav Vadstein, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for Bioteknologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Hovedveileder for oppgaven var professor Olav Vadstein.

Jeg vil gjerne takke Olav for all hjelp og veiledning både under planlegging av forsøket, utføring av det praktiske arbeidet, og stor hjelp under skriving av oppgaven. Jeg vil også rette en stor takk til forsker Matilde Skogen Chauton for uunnværlig hjelp og opplæring på laboratoriet. Videre vil jeg takke alle medstudenter for å skape et godt arbeidsmiljø, og spesielt Kjell Rune Jonassen for sprell på lesesalen og hjelp med retting av oppgaven. Jeg vil også takke ansatte ved NTNU Sealab for rask og effektiv behandling av prøver sendt ut i siste liten. Til slutt vil jeg takke alle andre støttespillere som har bidratt til 5 fantastiske år i Trondheim.

Sammendrag

Mineralolje er en begrenset og ikke-fornybar resurs, og drivstoff produsert fra mineralolje har flere negative effekter på miljøet. Dette gjør at det på lang sikt vil være nødvendig med en alternativ energikilde som er både fornybar og mer miljøvennlig. Vann-, vind og solkraft er eksempler på alternative energikilder som er både fornybare og mer miljøvennlige, men ingen av disse kan direkte produsere en flytende energikilde/drivstoff som er nødvendig for person- og varetransport. Biodiesel fra mikroalger har blitt foreslått som et fornybart og miljøvennlig alternativ til konvensjonelle mineraloljebaserte drivstoff, men for at produksjon av biodiesel fra mikroalger skal være økonomisk lønnsomt kreves det en organisme med høy veksthastighet, og som har et høyt innhold av lipider egnet for biodieselproduksjon.

I dette prosjektet ble det forsøkt å indusere økt spesifikt lipidutbytte i mikroalgen *Isochrysis T-iso* ved bruk av N-begrensning, og å skape en genetisk flaskehals som selekterer for celler med høy lipidlagringskapasitet ved å lyssulte mikroalgen. Algestammen som ble brukt hadde allerede vært gjennom en runde med lyssulting under N-begrensning i et tidligere prosjekt utført ved NTNU av Sæther (2012). Reprodukerbarheten til resultatene ved oppskalering ble også testet. Det ble i tillegg utført sammenligning mellom lipidmåling ved hjelp av det lipidfargende stoffet Nile Red, og gravimetrisk bestemmelse av ekstraherte lipider.

Det maksimale oppnådde spesifikke lipidutbyttet var $0,408 \pm 0,015$ lipid/dw [g/g], etter totalt to runder med lyssulting under N-begrensning. Dette representerte en 63 % økning i forhold til en referansekultur, som hadde vært gjennom en runde med lyssulting under N-begrensning i prosjektet i 2012. Resultatene ble reproduisert under oppskalering. Ved sammenligning mellom lipidmålinger utført ved hjelp av Nile Red og gravimetriske målinger av ekstrahert lipid ble det funnet at de gravimetriske målingene gav 2,4 ganger så høyt lipidinnhold som Nile Red målingene, og at forholdet mellom de to var lineært i området målingene ble utført. Det ble dermed konkludert med at målinger utført med Nile Red, underestimerte det faktiske innholdet av nøytrale lipider.

Abstract

Mineral oil is a limited and non-renewable resource, and fuels produced from mineral oil have many negative effects on the environment. In the long run it will because of this be necessary to find an alternative energy source that is both renewable and more environmentally friendly. Wind, water and solar power are examples of renewable and environmentally friendly energy sources, but none of these can directly produce the liquid energy source/fuel that is necessary for personal and commercial transport. Biodiesel from microalgae has been suggested as a renewable and environmentally friendly alternative to conventional mineral oil based fuels, but the economic viability of production of biodiesel from microalgae will in part depend on acquiring an organism with a high lipid yield and high growth rate.

In this project it was attempted to induce an increased specific lipid yield in the microalgae *Isochrysis T-iso* through N-limitation, and by creating a genetic bottleneck that selected for cells with a high capacity for lipid storage through light starvation. The algal strain that was used had already been through one cycle of light starvation under N-limitation in an earlier project performed at NTNU by Sæther (2012). The ability to reproduce the results under larger scale conditions was also investigated. A comparison between lipid determination with the lipid probe Nile Red and gravimetric determination of extracted lipids was also conducted.

The maximum achieved lipid yield was 0.408 ± 0.015 lipid/dw [g/g], after a total of two cycles of light starvation under N-limitation. This represented a 63 % increase compared to the reference culture that had been through one cycle of light starvation under N-limitation. These results were reproduced under larger scale conditions. The comparison between the two lipid determination methods gave a linear relationship, with the gravimetric determination measuring a 2.4 times higher lipid content. From this it was concluded that the Nile Red method of measuring lipid content in cells underestimated the actual lipid content by a large margin.

Forkortelser

OD_{750} = Optisk tetthet målt ved 750 nm

QY = Quantum Yield, mål på fysiologisk tilstand til celler

NR= Nile Red (9-diethylamino-5-benzo[α]phenoksazine-5-en), fargestoff som binder seg selektivt til lipider, brukt til å analysere lipidinnhold i levende celler

f/2 = Sjøvannsmedium designet for vekst av marine alger

N = Nitrogen

C = Karbon

dw = tørrvekt

μ_{\max} = Maksimal veksthastighet for kultur i eksponentiell vekstfase

h = Time (tid)

Innhold

Forord.....	2
Sammendrag.....	4
Abstract.....	6
Forkortelser.....	8
Figurliste.....	12
1. Introduksjon.....	14
1.1 Bakgrunn.....	14
1.2 Biodiesel.....	14
1.3 Biodiesel fra mikroalger.....	16
1.4 Lipiddeteksjonsmetoder.....	19
1.5 Målet med oppgaven.....	19
2. Materialer og metoder.....	21
2.1 Organisme og dyrkningsbetingelser.....	21
2.2 Eksperimentelt: Mørkeseleksjon.....	21
2.3 Måling av biomasse og quantum yield.....	23
2.4 Måling av lipidinnhold.....	24
2.5 Kontrollforsøk: Evaluering av Nile Red og oppskalering.....	25
3. Resultater.....	26
3.1 Karbonanalyse og triolein standardkurve.....	26
3.2 Reproduserbarheten av økning av spesifikt lipidinnhold gjennom N-begrensning og lyssulting.....	27
3.3 Gjentatt lyssulting i variabel tidsperiode.....	30
3.4 Reproduserbarhet i oppskalerte kulturer.....	32
3.5 Lipidinnhold målt ved hjelp av NR vs. Ekstrahert lipidinnhold.....	34
3.6 Sammenligning av NR-signaler etter 15 og 25 minutters innfargingstid.....	36
4. Diskusjon.....	39
4.1 Metodisk evaluering.....	39
4.2 Biomasseutvikling og veksthastighet.....	41
4.3 Spesifikt lipidinnhold.....	42
4.4 Reproduserbarhet.....	43
4.5 Videre utfordringer.....	44
5. Konklusjon.....	45
6. Referanser.....	46

Vedlegg A.....	48
Utstysliste	48
Programvareoversikt.....	49
Vedlegg B.....	50
Rådata for kultur M,0.....	50
Rådata for kultur M,1.....	51
Rådata for kultur D,0.....	53
Rådata for kultur D,1.....	55
Rådata for kultur D,2.....	57
Rådata for kultur D,3.....	59
Rådata for kultur M.....	61
Rådata for kultur D.....	62

Figurliste

Figur 1: Reaksjonsligning for produksjon av biodiesel fra triglyserid.	15
Figur 2: skjematisk oversikt over en åpen "raceway" dam.....	17
Figur 3: Skjematisk oversikt over en fotobioreaktor.....	18
Figur 4: Vekstkurve for kultur D,0 med uttak av inokulum.	22
Figur 5: Bilde av inkubatorene brukt i kontrollforsøket.....	25
Figur 6: Standardkurve for triolein.....	26
Figur 7: Karbonanalyse utført på en kultur av <i>Isochrysis T-iso</i>	27
Figur 8: Biomasseutvikling for moderkultur M,0 sammenlignet med.....	28
Figur 9: Biomasseutvikling for lyssultet kultur M,1 sammenlignet med	28
Figur 10: Utvikling av spesifikt lipidutbytte i moderkultur M,0 sammenlignet med.....	29
Figur 11: Utvikling av spesifikt lipidutbytte i kultur M,1 etter	29
Figur 12: Biomasseutvikling på semilogaritmisk skala.....	30
Figur 13: Sammenligning av lipidakkumulering i kulturer som.....	31
Figur 14: Biomasseutvikling for de to oppskalerte kulturene M og D	32
Figur 15: Utvikling av spesifikt lipidinnhold i de to oppskalerte kulturene.....	33
Figur 16: Sammenligning av verdier for gravimetrisk bestemt lipidinnhold	34
Figur 17: Forholdet mellom spesifikt lipidinnhold.....	34
Figur 18: Forholdet mellom spesifikt lipidinnhold.....	35
Figur 19: Tidsscann for <i>Isochrysis T-iso</i>	36
Figur 20: Netto NR signal for kultur M målt etter 15 og 25 min innfargingstid.....	37
Figur 21: Netto NR signal for kultur M målt etter 15 og 25 min innfargingstid.....	38

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Mineralolje er en begrenset og ikke-fornybar resurs som har en negativ påvirkning på miljøet i form av høyt utslipp av drivhusgasser, i hovedsak CO₂. Drivhusgasser er en av de viktigste årsakene til global oppvarming, som bl.a. medfører lavere utbytte fra landbruk og dermed høyere matpriser, og negative effekter på kvaliteten av vannressurser (Greenwell et al., 2010). Andre negative miljøpåvirkninger fra mineralolje inkluderer oljeutslipp, som f.eks. Deepwater Horizon i 2010.

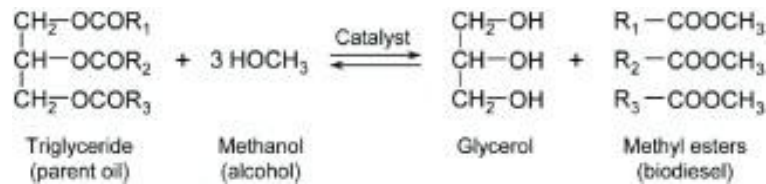
Oljepriser, og dermed prisen på drivstoff fra mineralolje, har også økt kraftig de siste årene, og stabiliteten til oljeprisen er avhengig av flere uforutsigbare faktorer (Greenwell et al., 2010). Mineralolje er også distribuert ujevnt på en global skala, noe som fører til at mange land er avhengig av å importere denne ressursen. Dette kan medføre store politiske og økonomiske utfordringer for disse landene (Greenwell et al., 2010, Demirbas and Fatih Demirbas, 2011, Rodolfi et al., 2009).

Disse faktorene fører til et behov for alternative miljøvennlige og fornybare energikilder. Vann-, vind- og solkraft er eksempler på fungerende alternative, miljøvennlige og fornybare energikilder, men det er også et stort behov for flytende energikilder til bruk i person- og varetransport, noe disse ikke kan levere direkte. Biodiesel er et fornybart, flytende drivstoff med lavere netto CO₂ utslipp (se kapittel 1.2) enn konvensjonelt drivstoff produsert fra mineralolje, og kan dermed være et viktig alternativ som energikilde både for å begrense utslippet av drivhusgasser og for å redusere avhengigheten av mineralolje (Greenwell et al., 2010, Demirbas and Fatih Demirbas, 2011, Rodolfi et al., 2009).

1.2 Biodiesel

Biodiesel er et flytende drivstoff som fremstilles fra biologiske materialer, og kan erstatte/substituere konvensjonelle mineraloljebaserte drivstoff som bensin og diesel (Demirbas, 2009). Biodiesel produseres fra olje utvunnet fra biomasse. Denne oljen består hovedsakelig av triglyserider (lipider), som er tre fettsyrer bundet til et glyserolmolekyl. Disse kan transesterifiseres ved at de reageres med et overskudd av en alkohol (f.eks. metanol) i

nærvær av en katalysator (Figur 1). Produktene fra denne reaksjonen er glyserol og ulike metylestere (metylester = biodiesel). Et overskudd av alkohol er fordelaktig da dette vil drive likevekten mot produktdannelse i reaksjonen (Chisti, 2007).



Figur 1: Reaksjonsligning for produksjon av biodiesel fra triglyserid.

Årsaken til at biodiesel generelt sett har et lavere CO₂ utslipp enn drivstoff fra mineralolje, er at all CO₂ som slippes ut allerede har blitt hentet direkte fra atmosfæren og blitt fiksert i organismen som drivstoffet lages av. Netto utslipp kommer derfor kun fra fremstillingsprosessen (fremstilling av gjødsel, vanning, etc.).

Biodiesel har potensialet til å redusere utslipp av drivhusgasser som CO₂, men ikke alle fremstillingsmetoder er like miljøvennlige. Noen har faktisk et høyere netto utslipp av CO₂, eller andre tilsvarende negative effekter på miljøet i forhold til drivstoff fremstilt fra mineralolje (Greenwell et al., 2010). I de tilfellene hvor netto utslipp er høyere enn for mineralolje, kan dette skyldes flere faktorer. En slik faktor er at dyrking av planter til produksjon av biodiesel krever store områder med fruktbar jord. Disse områdene fremdrives ved bl.a. fjerning av karbonrike skogsområder. Dette blir ofte gjort ved å brenne ned skogen og dermed frigis det store mengder CO₂. Dette vil motvirke positive miljøeffekter ved bruk av biodiesel. Dyrking av planter til produksjon av biodiesel krever også store mengder ferskvann, som er en verdifull resurs det er begrenset tilgang på mange steder på jorda (Gerbens-Leenes et al., 2009). En annen viktig faktor er at de jordområdene som tidligere ble brukt til å dyrke mat brukes til å produsere biodiesel, noe som vil legge press på verdens matreserver og tvinge opp matpriser (Greenwell et al., 2010).

Biodieselutbyttet fra landbaserte avlinger er begrenset av flere faktorer. Disse inkluderer behovet for enorme landområder med dyrkbar jord, tilgang til store mengder rent vann, og plantenes vekstsyklus. Vekstsyklusen til planter som blir brukt til produksjon av biodiesel (f.eks. raps) begrenser høsting av oljen til 1-2 ganger i året, noe som setter en øvre grense på mengden som kan høstes per areal per år (Chisti, 2007, Greenwell et al., 2010).

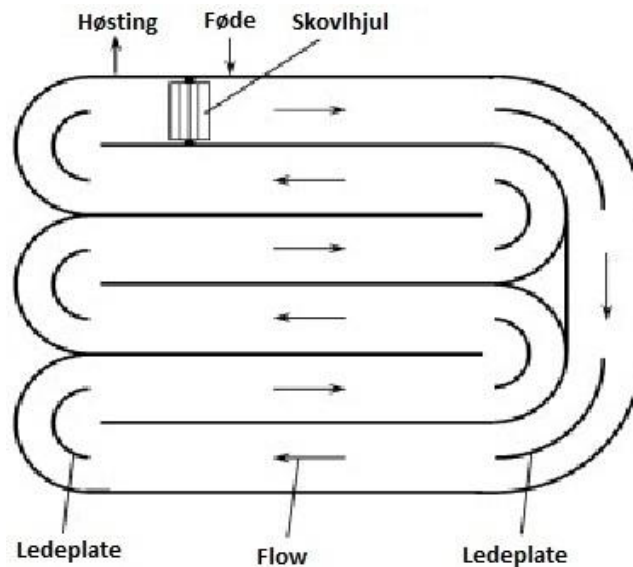
1.3 Biodiesel fra mikroalger

En mulig løsning på flere av problemene vedrørende produksjon biodiesel, er bruk av olje fra lipidrike mikroalger som en kilde for produksjon. Mikroalger vokser fort og kan høstes kontinuerlig. De krever ikke fruktbar jord for å vokse, så det er ikke nødvendig å fjerne store områder med karbonrik skog eller fortrenge matproduserende planter. Mange mikroalger inneholder, eller kan manipuleres til å lagre, mye lipider (over 60 % av tørrvekt) og kan dyrkes under mange forskjellige temperatur- og lysforhold. Dette gjør at mange land som ikke har noen nasjonale mineraloljereserver kan få tilgang til en kilde til flytende drivstoff (det siste er generelt for alle typer biodiesel, ikke spesifikt for biodiesel fra alger). Ettersom mange mikroalger kan dyrkes i saltvann, er kravet til ferskvann betydelig lavere enn for produksjon av biodiesel fra landbaserte avlinger. Dette kan være en enorm fordel mange steder på jorda. Biodiesel fra mikroalger ser også ut som det kan være den eneste biodieselskilden som har potensialet til å kunne forsyne nok drivstoff til å erstatte fossilt drivstoff til person- og varetransport på verdensbasis (Demirbas and Fatih Demirbas, 2011, Greenwell et al., 2010, Demirbas, 2011).

Mye av bakgrunnsforskningen på bruk av mikroalger som en kilde til biodiesel ble utført av US National Renewable Energy Laboratory (NREL) under navnet Aquatic Species Program fra 1978 – 1996. I løpet av programmets levetid ble det isolert og studert mer enn 3000 forskjellige mikroalger. Da programmet ble avsluttet i 1996 var konklusjonen at produksjon av biodiesel fra mikroalger ikke var økonomisk lønnsomt, ettersom produksjonsprisene per volum var doblet så høye som for fossilt drivstoff, selv ved bruk av “best case scenario” for fotosyntetisk produktivitet (Sheehan et al., 1998). Siden den gang har oljeprisene steget til et mer enn det tredobbelte, noe som indikerer at produksjon av biodiesel fra mikroalger kan være lønnsomt i dag. På bakgrunn av bl.a. dette har biodieselproduksjon fra mikroalger blitt sett på med stigende optimisme de siste årene.

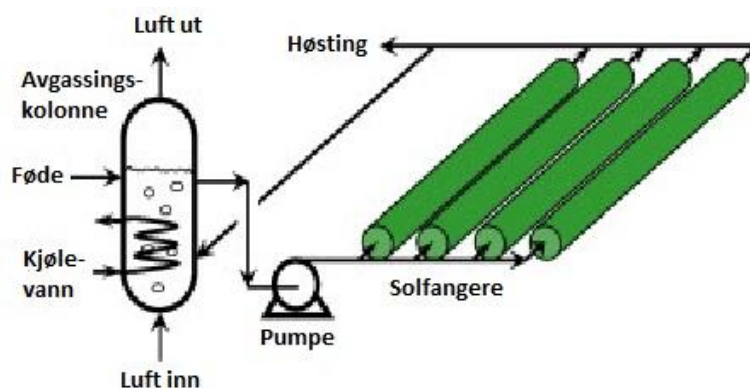
Dyrking av mikroalger i storskala gjøres på to forskjellige måter. Den ene metoden er å dyrke algene i en fotobioreaktor, og den andre er å dyrke algene i åpne dammer med sirkulasjon (åpne “raceway” dammer). Begge disse metodene benytter sollys som energikilde for algene. Det er også mulig å bruke kunstig lys som energikilde for algene, men dette krever mye energi og vil dermed øke produksjonskostnadene drastisk (Chisti, 2007, Greenwell et al., 2010).

Åpne “raceway” dammer er den eldste og mest utprøvde av de to dyrkningsmetodene, og baserer seg på å dyrke algene i åpne, grunne dammer (ofte rundt 0,3 m dype) hvor de suspenderte algene sirkuleres rundt ved hjelp av et skovlhjul og ledes rundt hjørner ved hjelp av ledeplater (Figur 2). Dammene fores kontinuerlig med nytt medium på dagtid, og skovlhjulet sørger for sirkulasjon hele døgnet for å hindre sedimentering av algene. Temperaturen i dammen holdes som regel mellom 20 og 30 °C, og all kjøling skyldes vann som fordampes i det åpne systemet. Fordampingen av vann fører også til at noe ferskvann må tilføres for å hindre oppkonsentrering av saltet fra saltvannsmediet som brukes til dyrking av marine mikroalger. Et problem med det åpne systemet er at de er utsatt for kontaminering av andre organismer. Åpne “raceway” dammer er billigere i både konstruksjon og drift enn fotobioreaktorer, men har lavere biomasseproduktivitet (Chisti, 2007, Greenwell et al., 2010).



Figur 2: skematisk oversikt over en åpen “raceway” dam.

Fotobioreaktorer er et lukket system hvor algene blir utsatt for lys ved at de pumpes gjennom solfangere (tynne gjennomsiktige rør, ca. 0,1 m i diameter) (Figur 3). Algene pumpes kontinuerlig fra avgassingskolonnen, hvor oksygen produsert av organismen stripes ved å pumpe luft gjennom kolonnen, gjennom solfangerne, og tilbake til avgassingskolonnen. Sedimentering av alger i solfangerne forhindres ved å opprettholde turbulent strømning i rørene. Det lukkede systemet gjør at helt rene kulturer kan kultiveres over lengre tid uten stor fare for kontaminasjon, men medfører også et behov for aktiv kjøling siden det ikke er noe fordampning å snakke om. Fotobioreaktorer er dyrere i både konstruksjon og drift enn åpne “raceway” dammer, men biomasseproduktiviteten er høyere (Chisti, 2007).



Figur 3: Skjematisk oversikt over en fotobioreaktor.

Til tross for alle fordelene ved bruk av mikroalger til produksjon av biodiesel, er denne produksjonsmetoden fortsatt ikke økonomisk lønnsom. For å øke den økonomiske lønnsomheten er man bl.a. avhengig av forbedringer og/eller effektiviseringer på flere områder. En av de viktigste utfordringene er å finne/utvikle en organisme som kan gi et stabilt og høyt nok lipidutbytte til at produksjonsprosessen ikke krever mer energi enn det potensielt kan hentes ut av det ferdige produktet (negativ netto energikostnad) (Greenwell et al., 2010, Rodolfi et al., 2009). Dette innebærer at organismen må ha et høyt spesifikt lipidinnhold, og høy veksthastighet slik at en kultur kan oppnå et høyt maksimalt lipidutbytte på kortest mulig tid.

Valg av optimal art gjøres som regel ved å analysere et vidt spekter av naturlig forekommende isolater for de ønskede egenskapene. De stammene som virker mest lovende plukkes ut og det kan forsøkes å forbedre de ønskede egenskapene ved hjelp av seleksjon, adaptasjon og/eller genetisk manipulering (Singh et al., 2011). Forbedring gjennom seleksjon er temaet for denne oppgaven. Tvunget seleksjon kan oppnås ved å utsette en organisme for et dyrkningsregime hvor de cellene med de ønskede egenskapene vil ha en stor fordel. Seleksjon for økt lipidlagringskapasitet kan oppnås ved hjelp av lyssulting. Lyssulting vil lage en genetisk flaskehals slik at bare de algene som har lagret mest energi (i form av lipider) overlever, mens resten sult og dør. De cellene som overlever vil deretter kunne dyrkes opp på nytt, og denne nye kulturen vil da kun inneholde de cellene med høyest lipidlagringskapasitet. Lyssulting kan oppnås ved å mørkeinkubere en kultur i en tildekket beholder. Denne strategien for økning av spesifikt lipidinnhold forutsetter at de fenotypiske forskjellene mellom høyt og lavt lipidinnhold er genetisk baserte. Økt lipidutbytte kan også oppnås ved å dyrke en mikroalge under N-begrensning (Sukenik and Wahnou, 1991). Prinsippet bak å indusere økt lipidproduksjon ved hjelp av N-begrensning er at algen vokser ved celledeling som normalt så lenge det er nok nitrogen tilgjengelig. Når all nitrogen er

oppbrukt fortsetter algen å fikserer CO₂, men kan ikke lenger dele seg, så karbonet blir lagret i cellen som lipider eller karbohydrater (Rodolfi et al., 2009).

1.4 Lipiddeteksjonsmetoder

Den tradisjonelle metoden for bestemmelse av lipidinnhold i en mikroorganisme innebærer å ekstrahere lipidene direkte og kvantifisere innholdet gravimetrisk. Dette er både tidkrevende, ødelegger cellene og krever en betydelig mengde materiale (10-20 mg biomasse per analyse). Nile Red (9-diethylamino-5-benzo[*a*]phenoksazine-5-en) er et lipidbindende fluoriserende fargestoff som gjør det mulig å analysere lipidinnholdet i celler *in situ* på en billig og enkel måte. Analysen kan utføres uten å ødelegge cellene, og uten behov for store mengder biomasse. Dette gjør det mulig å bruke dette fargestoffet til å følge lipidutviklingen i en kultur over tid uten at denne kulturen trenger å være veldig stor, noe som er fordelaktig i forsøk på lab-skala. Nile Red (NR) er lett-løselig i de fleste organiske løsemidler og binder seg selektivt til lipider, men løselighet og fluorescens er neglisjerbar i vann (Sitepu et al., 2012). Det har blitt rapportert problemer ved bruk av NR ved at metoden ikke gir forventet utslag hos alle algearter. Grunnen til dette er sannsynligvis at disse arter har tykke og rigide cellevegger som hindrer diffusjon av NR inn i cellene. Det har også blitt rapportert at tilsetning av DMSO eller lignende stoffer kan virke som en bærer for fargestoffet slik at det lettere kan trenge gjennom celleveggen (Chen et al., 2009, Sitepu et al., 2012). Forsøk utført av Sæther (2012) tydet på at tilsats av DMSO ikke hadde noen påvirkning på resultatene ved bruk av NR på algene som ble brukt i denne oppgaven.

1.5 Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven var stammeforbedring ved hjelp av seleksjon. Egenskapene som ble forsøkt forbedret var det spesifikke lipidutbyttet (lipid/biomasse) i mikroalgen *Isochrysis T-iso*. Dette ble forsøkt utført ved hjelp av N-begrensning og lyssulting. N-begrensning er en metode for å indusere økt lipidlagring i cellene, mens Lyssulting er et seleksjonsregime som har som formål å selektere bort celler med lav lipidlagringskapasitet (se kapittel 1.3). Det ble også forsøkt å finne en sammenheng mellom *in situ* måling av lipidinnhold ved hjelp av NR, og den faktiske mengden av intracellulære lipider funnet ved ekstraksjon og gravimetrisk analyse. Oppgaven var en fortsettelse av en prosjektoppgave

utført ved NTNU av Sæther (2012). Det ble også forsøkt å verifisere resultatene fra forsøk utført i løpet av denne prosjektoppgaven, og reproduserbarheten av oppnådde resultater under oppskalerte forhold.

2. Materialer og metoder

2.1 Organisme og dyrkningsbetingelser

Mikroalgen som ble undersøkt i denne oppgaven var *Isochrysis T-iso* mottatt fra SINTEF Sea Lab Trondheim. *Isochrysis sp.* har tidligere blitt nevnt som en mikroalge med relativt høyt lipidinnhold (25-33% av tørrvekt) (Chisti, 2007). Mediet som ble benyttet i forsøkene var 1/10 N-redusert f/2-medium, forberedt i henhold til Guillard (1975), men med konsentrasjonen av NaNO₃ redusert til 1/10 av den opprinnelige konsentrasjonen for å oppnå N-begrensede dyrkningsbetingelser. Forsøkene ble utført ved å fortynne suspensjoner av mikroalgen med N-redusert medium og inkubere de i et lysskap (Termaks, se Vedlegg A) ved 20 °C med en lys/mørke syklus på 16/8 timer (lys fra 06:00 til 22:00), 100 – 150 µmol/s m² lyskonsentrasjon, og moderat lufting med fuktet luft. Luftingen sørget for tilførsel av CO₂, og omrøring av kulturene slik at disse ble holdt tilnærmet homogen. Under inkubering ble biomasse og lipidinnhold analysert regelmessig.

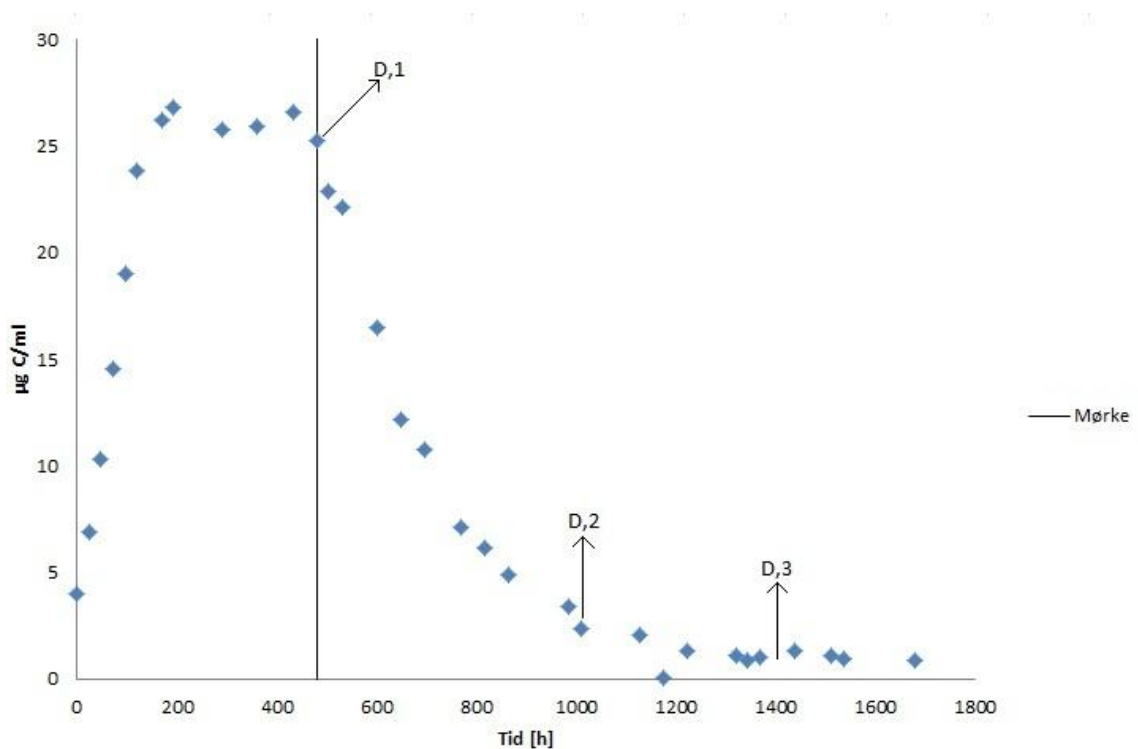
2.2 Eksperimentelt: Mørkeseleksjon

Målet med kulturene beskrevet her var å teste effekten av dyrkningsstrategien beskrevet i kapittel 1.5, og å teste reproduserbarheten til bruk av genetisk flaskehals til seleksjon av celler med høy lipidlagringskapasitet under N-begrensning, i forhold til tidligere forsøk utført av Sæther (2012). Kulturene brukt i denne oppgaven ble dyrket opp under noe høyere lysintensitet i forhold til kulturene i Sæther (2012). Kulturene er oppsummert i Tabell 1.

Isochrysis T-iso ble dyrket opp i to batchkulturer a 1400 ml under N-begrensning, som et grunnlag for varianter av dyrkningsstrategien. De to kulturene ble henholdsvis dyrket fra en moderkultur (M,0) og fra en kultur som allerede hadde vært gjennom en omgang med lyssulting (D,0). Begge kulturene ble overført til mørke etter at de hadde sluttet å akkumulere lipider basert på *in situ* lipidmålinger. En prøve ble tatt ut av kultur D,0 før den ble overført til mørke, og brukt som inokulum til en egen kultur (D,1). Denne ble brukt som referanse for kulturer som senere ble utsatt for videre lyssulting. Kultur M,0 ble brukt til å teste reproduserbarheten i forhold til et tidligere forsøk utført av Sæther (2012), og ble derfor dyrket på samme måte som i dette prosjektet.

Etter at kultur M,0 hadde blitt utsatt for lyssulting i ca. 20 døgn (tilsvarende kulturen i prosjektet fra 2012) ble det tatt ut en prøve som ble brukt som inokulum til en ny kultur (M,1) på 400 ml. Denne nye kulturen ble deretter analysert for biomasse og lipidinnhold på samme måte som beskrevet i kapittel 2.3 og 2.4, for å se om den gav samme resultat som kulturen dyrket opp etter mørkeinkubering i prosjektet høsten 2012.

For å teste effekten av mørkeinkubering over en varierende tidsperiode, ble det tatt ut prøver av kultur D,0, først 20 døgn så igjen 40 døgn etter start av mørkeinkubering (se Figur 4). Disse prøvene ble deretter dyrket opp som egne kulturer a 400 ml (henholdsvis D,2 og D,3) og analysert for biomasse og lipidinnhold på samme måte som beskrevet i kapittel 2.3 og 2.4.



Figur 4: Vekstkurve for kultur D,0 med uttak av inokulum for oppdyrking av nye kulturer. Den vertikale svarte linjen indikerer tidspunkt for start av mørkeinkubering.

Tabell 1: Oppsummering av kulturene beskrevet i kapittel 2.2 og 2.5.

<i>Kultur</i>	<i>Beskrivelse</i>	<i>Mørkeinkubert</i>	<i>Formål</i>
M,0	1400 ml kultur inokulert fra en moderkultur	Ja	Test av reproduserbarhet i forhold til tidligere forsøk (Sæther, 2012)
M,1	400 ml kultur, inokulert fra M,0 etter 20 døgn i mørke	Nei	Test av reproduserbarhet i forhold til tidligere forsøk (Sæther, 2012)
D,0	1400 ml kultur inokulert fra tidligere mørkeinkubert kultur	Ja	Utgangspunkt for kulturer brukt til test av effekten av variabel lengde av mørkeinkubering
D,1	400 ml kultur inokulert fra D,0 før mørkeinkubering	Nei	Referanse for test av effekten av variabel lengde av mørkeinkubering
D,2	400 ml kultur inokulert fra D,0 etter 20 døgn i mørke	Nei	Test av effekten av gjentatt mørkeinkubering
D,3	400 ml kultur inokulert fra D,0 etter 40 døgn i mørke	Nei	Test av effekten av gjentatt mørkeinkubering over lengre tid
M	30 L kultur inokulert fra M,0 før mørkeinkubering	Nei	Test av NR metode og oppskalering
D	30 L kultur inokulert fra D,2	Nei	Test av NR metode og oppskalering

2.3 Måling av biomasse og quantum yield

Biomassen ble målt for å kunne følge de forskjellige vekstfasene til mikroalgen, og for å kunne beregne spesifikt lipidinnhold. Som proxy for biomassen ble optisk tetthet (OD) målt ved 750 nm med et spektrofotometer (HITACHI U-5100 spektrofotometer, se Vedlegg A). Ved 750 nm vil ikke pigmenter i algene interferere med den målte absorbansen (Olav Vadstein, pers med). Det ble også utført karbonanalyse på en av kulturene for å relatere OD₇₅₀ målinger direkte til total konsentrasjon biomasse (tørrvekt/ml) i kulturene, ettersom det totale karboninnholdet ble antatt å representere 46 % av tørrvekten til cellene (Olav Vadstein, pers med).

Fysiologisk tilstand til cellene ble også fulgt ved å måle Quantum Yield (QY). QY er et mål på hvor stor prosentandel av lyset tatt opp av algen som går inn i fotosyntetiske prosesser, og kan dermed brukes som et mål på den fysiologiske tilstanden til cellene i kulturen. QY ble målt med et fluorometer (Aquapen, se Vedlegg A).

2.4 Måling av lipidinnhold

To metoder ble brukt for å bestemme lipidinnhold i mikroalgen i denne oppgaven, gravimetrisk bestemmelse etter ekstraksjon av lipider og *in situ* bestemmelse ved hjelp av NR. Nile Red (Sigma-Aldrich, 72485, CAS: 7385-67-3) ble brukt til kontinuerlig overvåkning av lipidinnholdet i algekulturene, og gravimetrisk bestemmelse ble brukt til å undersøke sammenhengen mellom lipidinnhold målt med denne metoden og lipidinnhold målt ved hjelp av NR. Analyse av lipidinnhold ble utført ved først å måle bakgrunnsfluorescens i kulturen, så ble det tilsatt 15 µl Nile Red løsning (250 mg/l) til 2,5 ml av en kultur, til en endelig NR konsentrasjon på 1,5 µg/ml. Prøven ble deretter inkubert i mørke ved romtemperatur, og det totale fluorescenssignalet fra NR ble målt med et fluorometer (Aquafluor, se Vedlegg A) etter 15 og 25 minutter. Netto fluorescens fra NR bundet til lipider ble deretter beregnet ved å trekke fra den målte bakgrunnsfluorescensen fra den totale NR fluorescensen (netto fluorescens = total NR fluorescens – bakgrunnsfluorescens). Innfargingstid på 15 min ble brukt for å sammenligne lipidinnhold i kulturene, mens målingene etter 25 min ble brukt for å undersøke forskjellen mellom de to innfargingstidene. Det spesifikke lipidinnholdet ble funnet ved å beregne netto NR-fluorescens per biomasse. En fortynningskurve med målinger av triolein (glyceryl trioleate, Sigma-Aldrich, CAS: 122-32-7) tilsatt NR ble laget for å kunne gi et estimat av hva de relative NR målingene representerte i µg lipid/ml. Alle prøver ble tatt 6-8 timer etter start av belysning i lyssyklusen.

For å finne optimal innfargingstid for NR farging av prøver, ble det utført et tidsscann på en prøve fra tidlig stasjonær vekstfase farget med NR, over 40 minutter fra innfarging. Et nytt tidsscann ble utført på en prøve i sen stasjonær vekstfase for å undersøke om optimal innfargingstid var uavhengig av vekstfasen. Emisjons- og eksitasjonsbølgelengden som ble brukt i tidsscannet var henholdsvis 575 nm og 525 nm, som var de samme bølgelengdene som ble brukt til måling av NR fluorescens under de andre forsøkene. Dette forsøket ble utført med et spektrofluorometer (Perkin Elmer, se Vedlegg A).

Gravimetrisk lipidbestemmelse etter ekstraksjon av lipid ble utført ved å ta ut en gitt mengde kultur tilsvarende 20 mg tørrvekt celler (varierende volum avhengig av kulturens tetthet). Disse ble sentrifugert ved 8000 rpm i 10 min, og de resulterende pelletene ble vasket to ganger med 0,5 M ammonium format for å fjerne eventuelle saltrester fra mediet (Doan and Obbard, 2012) slik at disse ikke påvirker tørrvekten til prøven. Sentrifugeringen ble utført i en Sorvall Instruments RC5C sentrifuge (se Vedlegg A). Prøvene ble deretter frysetørket og sendt til NTNU Sealab for lipidekstraksjon og gravimetrisk lipidanalyse etter en modifisert versjon av (Bligh and Dyer, 1959) sin metode.

2.5 Kontrollforsøk: Evaluering av Nile Red og oppskalering

For å teste sammenhengen mellom lipidinnhold målt med NR og faktisk lipidinnhold ble to nye kulturer (M og D) a 30 L dyrket opp (en inokulert fra moderkultur M,0 før mørkeinkubering (M) og en inokulert fra mørkeinkubert kultur D,2 (D)), se Tabell 1. Inkubatorene brukt i dette forsøket var sylindriske med en høyde på 100 cm og en diameter på 22 cm, med åpning for lufting i toppen og tapping av kultur i bunn (se Figur 5). Inkubatorene ble spesiallaget for dette forsøket. Disse kulturene ble analysert for biomasse og lipidinnhold på samme måte som beskrevet i kapittel 2.3 og 2.4. I tillegg til lipidanalyse ved hjelp av NR, ble det tatt ut prøver for ekstraksjon og gravimetrisk bestemmelse av lipider for å kunne sammenligne de målte NR-signalene med det faktiske lipidinnholdet i cellene.

Dette forsøket ble også brukt til å teste reproduserbarheten til forsøkene under oppskalerte forhold. Dimensjonen på inkubatorene og størrelsen på kulturene førte til at det ble mindre lys per celle ettersom cellene ytterst i kulturen vil skygge for lyset til cellene nærmere midten av kulturen.



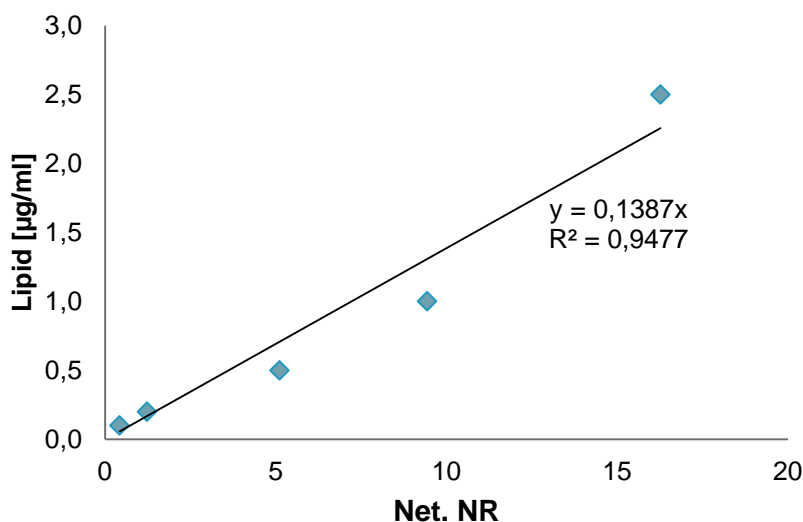
Figur 5: Bilde av inkubatorene brukt i kontrollforsøket.

3. Resultater

Resultatene fokuserer på testing av metoder og spesifikke lipidinnhold i kulturer som ble utsatt for seleksjon og var antatt å selekttere for celler med høyt lipidinnhold. Alle målinger av lipidinnhold (NR) og biomasse (OD) ble utført som relative målinger som deretter ble relatert til fysiske størrelser (lipid og karbon per tørrvekt). Usikkerheten i beregnede verdier er gitt som enkle standardavvik og konfidensen ble beregnet ved hjelp av student-t test. Rådata for alle forsøk er gitt i Vedlegg B.

3.1 Karbonanalyse og triolein standardkurve

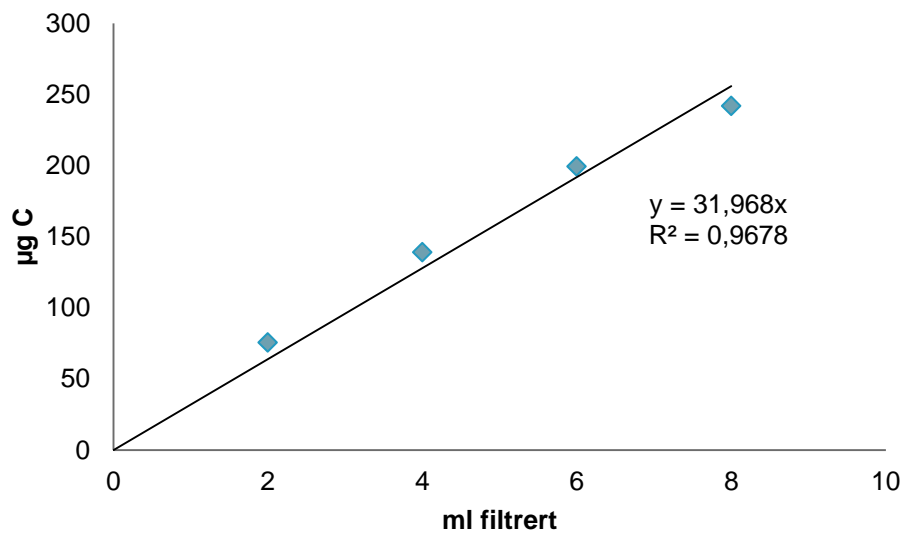
Figur 6 viser standardkurven som ble laget ved å måle fluorescenssignalet fra en fortyningsserie av det nøytrale lipidet triolein etter at denne ble tilsatt NR. Figuren viser en lineær sammenheng mellom lipidinnhold og netto NR-signal, og at et netto NR-signal på 1 tilsvarer en lipidkonsentrasjon (gitt i trioleinekvivalenter) på 0,14 µg/ml.



Figur 6: Standardkurve for triolein, produsert ved måling av en fortyningsserie tilsatt NR

Figur 7 viser resultatet fra en karbonanalyse utført på kultur M,1. Kulturen som ble analysert hadde på analysetidspunktet en OD_{750} på 0,338 og analysen gav en karbonkonsentrasjon på ca. 32 µg C/ml. Dette gav en relasjonsfaktor mellom OD_{750} og

karbonkonsentrasjon (karbonkonsentrasjon/OD₇₅₀) på 94,7 (algekarboninnhold [$\mu\text{g C/ml}$] = OD₇₅₀ · 94,7, og algebiomasse [$\mu\text{g dw/ml}$] = OD₇₅₀ · 94,7/0,46).

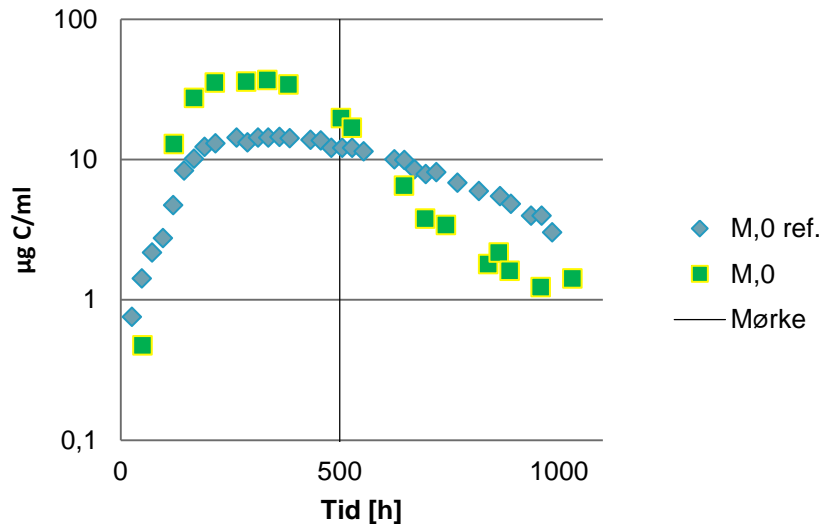


Figur 7: Karbonanalyse utført på en kultur av *Isochrysis T-iso* i tidlig stasjonær fase ved en OD₇₅₀-verdi på 0,338.

Resultatene fra disse to analysene ble brukt til å omregne det relative spesifikke lipidinnholdet (NR/OD₇₅₀) i kulturene til trioleinekvivalenter/tørrvekt (dw) (triolein fortynningsserie for NR målinger til trioleinekvivalenter og karbonanalyse for OD₇₅₀ til tørrvekt).

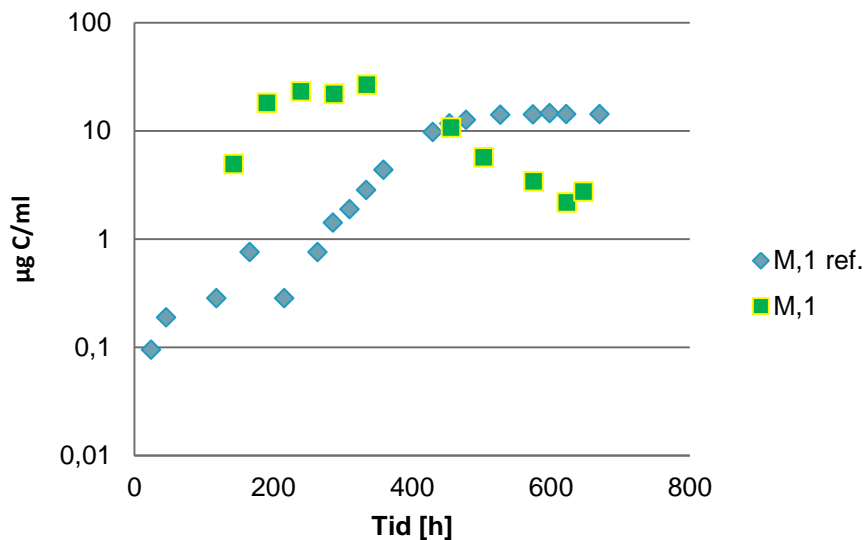
3.2 Reproduserbarheten av økning av spesifikt lipidinnhold gjennom N-begrensning og lyssulting

Reproduserbarheten til forsøk på økt spesifikt lipidinnhold gjennom lyssulting under N-begrensning og re-kultivering utført av Sæther (2012), ble testet ved å utføre forsøkene på nytt under samme forhold. Eneste faktor som ble endret mellom de to forsøkene var en økning i lysintensitet. Figur 8 viser forskjellen i utviklingen av biomasse mellom kulturene i de to forsøkene før og etter mørkeinkubering.



Figur 8: Biomasseutvikling for moderkultur M,0 sammenlignet med referanseverdier hentet fra Sæther (2012). Den vertikale svarte linje indikerer tidspunktet for start av mørkeinkubering.

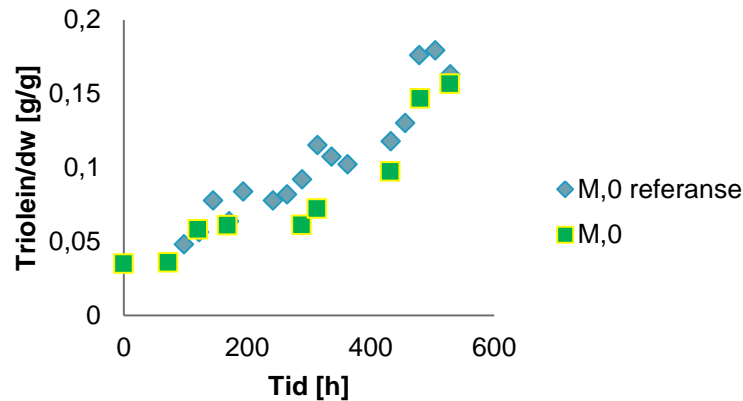
Figur 9 viser forskjellen i utviklingen av biomasse mellom kulturene i de to forsøkene etter at de har vært gjennom en periode med mørkeinkubering og blitt dyrket opp på nytt.



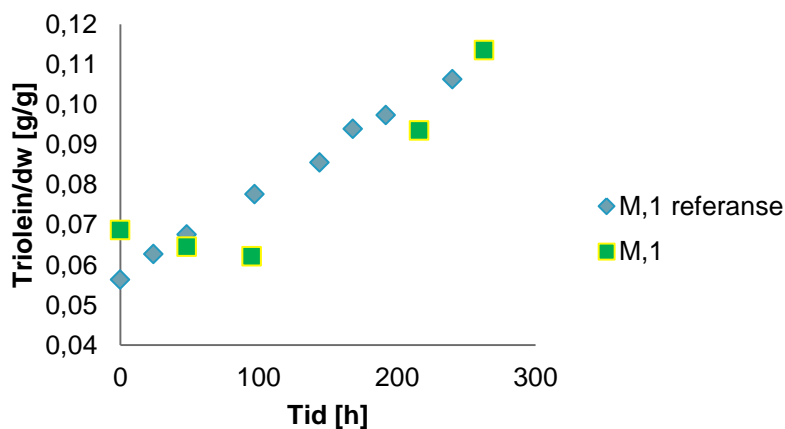
Figur 9: Biomasseutvikling for lyssultet kultur M,1 sammenlignet med referanseverdier hentet fra Sæther (2012).

Figur 8 og Figur 9 viser at kulturene som ble dyrket opp under høyere lysintensitet oppnådde en høyere maksimal biomasse, men også at biomassekonsentrasjonen sank raskere (kulturen gikk raskere over i dødsfase).

Figur 10 viser forskjellen i lipidakkumulering mellom kulturene i de to forsøkene før de ble overført til mørke. Figur 11 viser forskjellen i lipidakkumulering mellom kulturene i de to forsøkene etter at de har vært gjennom en like lang periode med lyssulting.



Figur 10: Utvikling av spesifikt lipidutbytte i moderkultur M,0 sammenlignet med referanseverdier. Referanseverdiene er hentet fra Sæther (2012), og verdiene er justert slik at tid = 0 representerer start av stasjonær vekstfase for begge kulturene

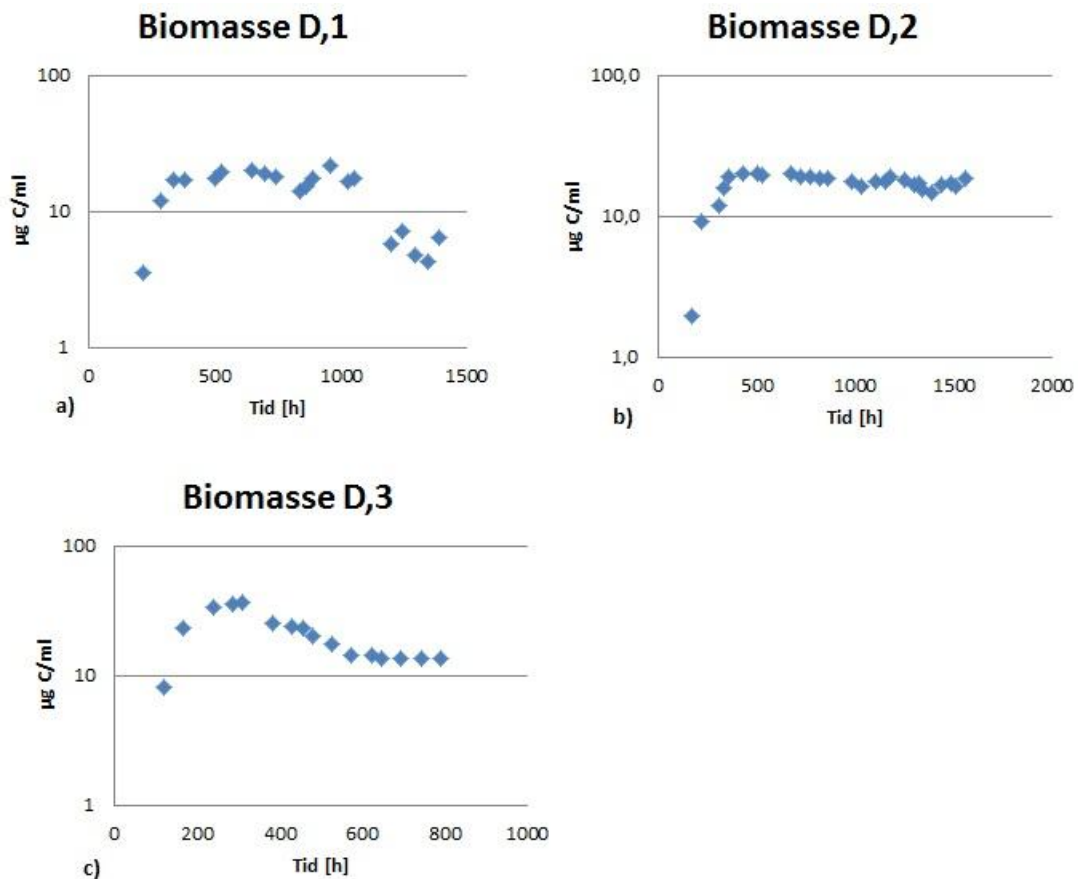


Figur 11: Utvikling av spesifikt lipidutbytte i kultur M,1 etter en runde med lyssulting under N-begrensning sammenlignet med referanseverdi. Referanseverdier er hentet fra Sæther (2012) og alle verdier er justert slik at tid = 0 representerer start av stasjonær vekstfase for begge kulturene.

Til tross for forskjell i lysintensitet og biomasseutvikling, viser Figur 10 og Figur 11 at forskjellen i utvikling av spesifikt lipidinnhold mellom kulturene fra de tidligere forsøkene og forsøkene utført i dette prosjektet var neglisjerbar.

3.3 Gjentatt lyssulting i variabel tidsperiode

Figur 12 viser biomasseutviklingen til de tre lyssultede kulturene (D,1, D,2 og D,3) på semilogaritmisk skala. Figuren viser at kultur D,3 oppnådde et noe høyere biomasseinnhold enn de to andre kulturene.



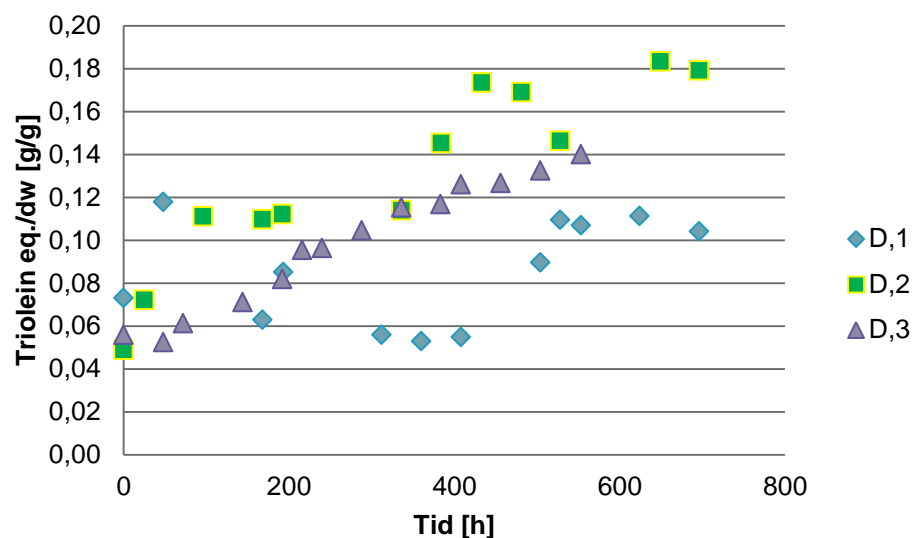
Figur 12: Biomasseutvikling på semilogaritmisk skala. a) kultur etter en runde med mørkeinkubering, b) kultur etter to runder mørkeinkubering, c) kultur etter to runder mørkeinkubering hvor den siste mørkeperioden var dobbelt så lang som den første.

Tabell 2: Maksimal veksthastighet og gjennomsnittlig maksimal biomasse for de tre lyssultede kulturene D,1, D,2 og D,3 sammenlignet med moderkulturen (M,0). Usikkerheten er funnet ved hjelp av generalisert lineær modell i PAST, se Vedlegg A.

Kultur	$\mu_{max} [h^{-1}]$	Maks biomasse [$\mu\text{g C/ml}$]
M,0	$0,0354 \pm 0,007$	$34,0 \pm 1,0$
D,1	$0,0190 \pm 0,004$	$18,4 \pm 0,2$
D,2	$0,0263 \pm 0,004$	$19,9 \pm 0,1$
D,3	$0,0115 \pm 0,007$	$35,6 \pm 0,6$

Den maksimale veksthastigheten og gjennomsnittlig maksimal biomasse for de tre lyssultede kulturene (D,1, D,2 og D,3) er vist i Tabell 2 sammen med veksthastigheten og maksimal gjennomsnittlig biomasse for moderkulturen (M,0) som ikke hadde vært utsatt for seleksjon gjennom lyssulting. Ingen av de tilsynelatende forskjellene i maksimal veksthastighet var signifikante innenfor et 90 % konfidensintervall ($p > 0,1$), men både kultur D,1 og D,2 viste en signifikant lavere gjennomsnittlig maksimal biomasse enn kultur M,0 ($p < 0,05$). Kultur D,3 derimot viste ingen signifikant forskjell i gjennomsnittlig maksimal biomasse i forhold til kultur M,0 ($p > 0,1$).

Figur 13 viser utviklingen av det spesifikke lipidinnholdet i de tre lyssultede kulturene D,1, D,2, og D,3 som henholdsvis hadde vært gjennom en runde med lyssulting, to runder med lyssulting og to runder med lyssulting hvor den andre mørkeperioden var dobbelt så lang som den første. Gjentatt lyssulting førte til en økning i det spesifikke lipidinnholdet i cellene, men at en lengre periode med lyssulting gav ikke en like stor økning. Figuren viser også at referansekulturen (D,1) brukte noe lengre tid på å akkumulere lipider. Resultatene er oppsummert i Tabell 3, som viser den gjennomsnittlige maksimalverdien av spesifikt lipidinnhold for de tre kulturene etter at lipidnivået hadde flatet ut.



Figur 13: Sammenligning av lipidakkumulering i kulturer som har vært utsatt for en runde med lyssulting (D,0), to runder med lyssulting (D,2), og to runder med lyssulting hvor den siste mørkeperioden var ca. dobbelt så lang som den første (D,3). Verdiene er standardisert lik at tid = 0 tilsvarer starten av stasjonær fase for alle kulturene.

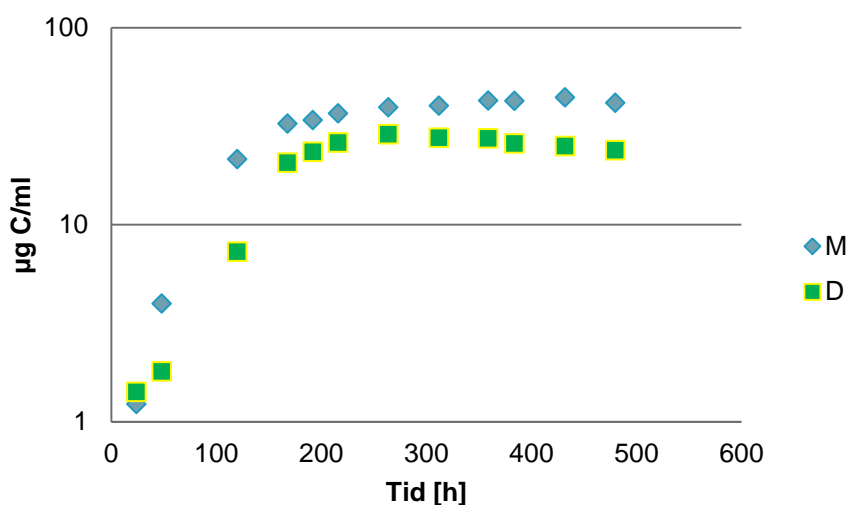
Tabell 3: Gjennomsnittlig maksimalt lipidinnhold for de tre lyssultede kulturene D,1, D,2 og D,3.

Kultur	Gj.snitt max spesifikt lipidinnhold triolein/ dw [g/g]
D,1	0,104 ± 0,004
D,2	0,170 ± 0,006
D,3	0,131 ± 0,003

Tabellen viser at gjentatt lyssulting med forlenget mørkeinkuberingstid (D,3) gav en økning i spesifikt lipidinnhold på ca. 26 %, mens gjentatt lyssulting med samme mørkeinkuberingstid (D,2) gav en økning på ca. 63 %. Dette representerer en signifikant økning for både D,2 og D,3 over D,1 ($p < 0,05$).

3.4 Reproduserbarhet i oppskalerte kulturer

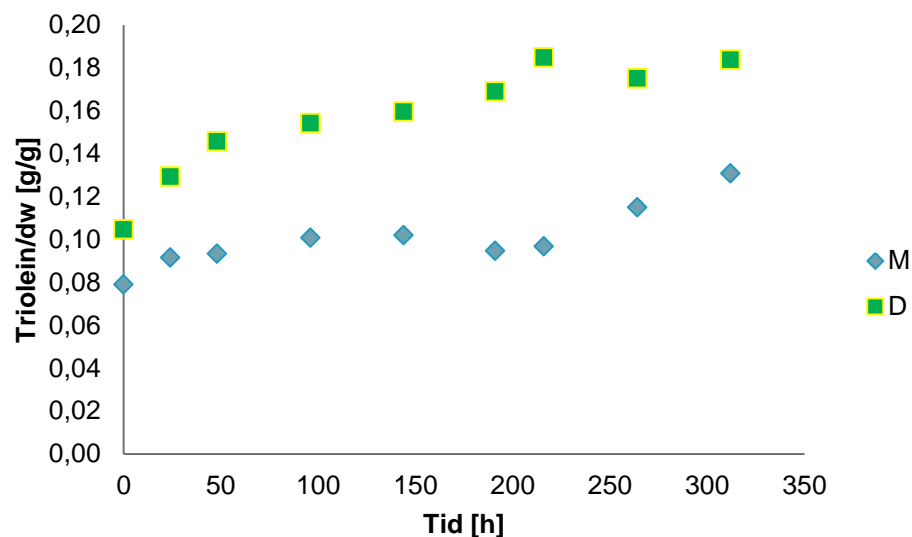
Utviklingen av biomasse i de to oppskalerte kulturene M og D på semilogaritmisk skala er vist i Figur 14. Kultur M oppnådde en 56 % høyere biomassekonsentrasjon enn kultur D.



Figur 14: Biomasseutvikling for de to oppskalerte kulturene M og D på semilogaritmisk skala.

Maksimal veksthastighet μ_{\max} for kultur M og D var henholdsvis $0,0223 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ og $0,0203 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ (Usikkerheten er funnet ved hjelp av generalisert lineær modell i PAST (Hammer et al., 2001), se Vedlegg A). Det var ingen signifikant forskjell ($p >> 0,1$) mellom den maksimale veksthastigheten til de to kulturene. Gjennomsnittlig maksimal biomasse for de to kulturene var $41,8 \pm 0,3$ for kultur M og $27,5 \pm 0,3$ for kultur D, noe som representerer en signifikant forskjell ($p << 0,01$).

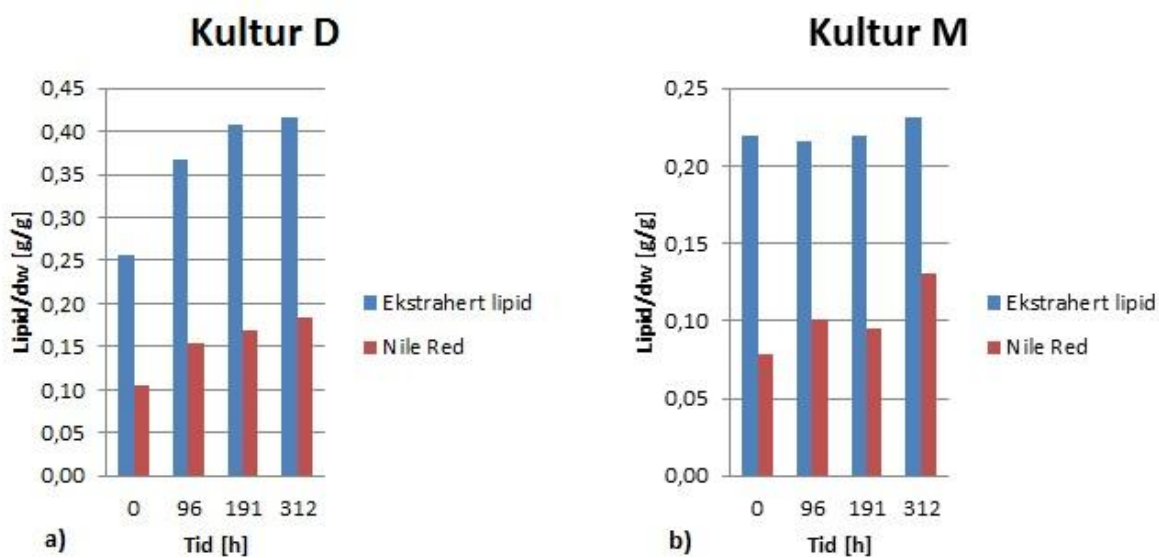
Figur 15 viser at det spesifikke lipidinnholdet i de oppskalerte kulturene M og D var 63 % høyere i kulturen som var blitt utsatt for lyssulting under N-begrensning (D) enn i kulturen som kun var blitt utsatt for N-begrensning (M). Resultatene fra de små (400-1400 ml) kulturene ble dermed reproduisert i de oppskalerte kulturene (30 L).



Figur 15: Utvikling av spesifikt lipidinnhold i de to oppskalerte kulturene brukt til vurdering av reproduserbarheten til oppskalerte kulturer. Verdiene er standardisert lik at tid = 0 tilsvarer starten av stasjonær fase for begge kulturene.

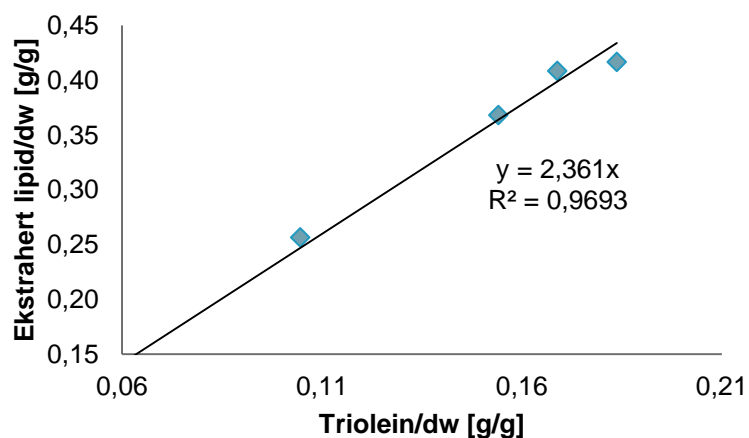
3.5 Lipidinnhold målt ved hjelp av NR vs. Ekstrahert lipidinnhold

Figur 16 viser en sammenligning mellom spesifikt lipidinnhold målt ved hjelp av NR, og målt gravimetrisk etter ekstraksjon av lipidene fra cellene. Det spesifikke lipidinnholdet målt ved hjelp av NR var betydelig lavere enn verdien funnet ved gravimetrisk bestemmelse av ekstraherte lipider.

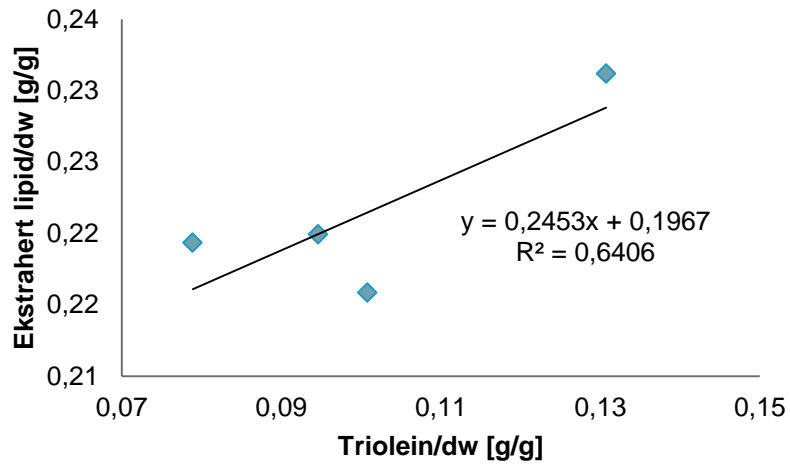


Figur 16: Sammenligning av verdier for gravimetrisk bestemt lipidinnhold og lipidinnhold målt ved hjelp av NR. a) viser sammenligningen for oppskalert kultur D, b) viser sammenligningen for oppskalert kultur M.

Figur 17 viser forholdet mellom de to målemetodene for oppskalert kultur D, og Figur 18 viser det samme for oppskalert kultur M.



Figur 17: Forholdet mellom spesifikt lipidinnhold målt ved hjelp av NR, og gravimetrisk bestemmelse etter lipidekstraksjon for oppskalert kultur D.

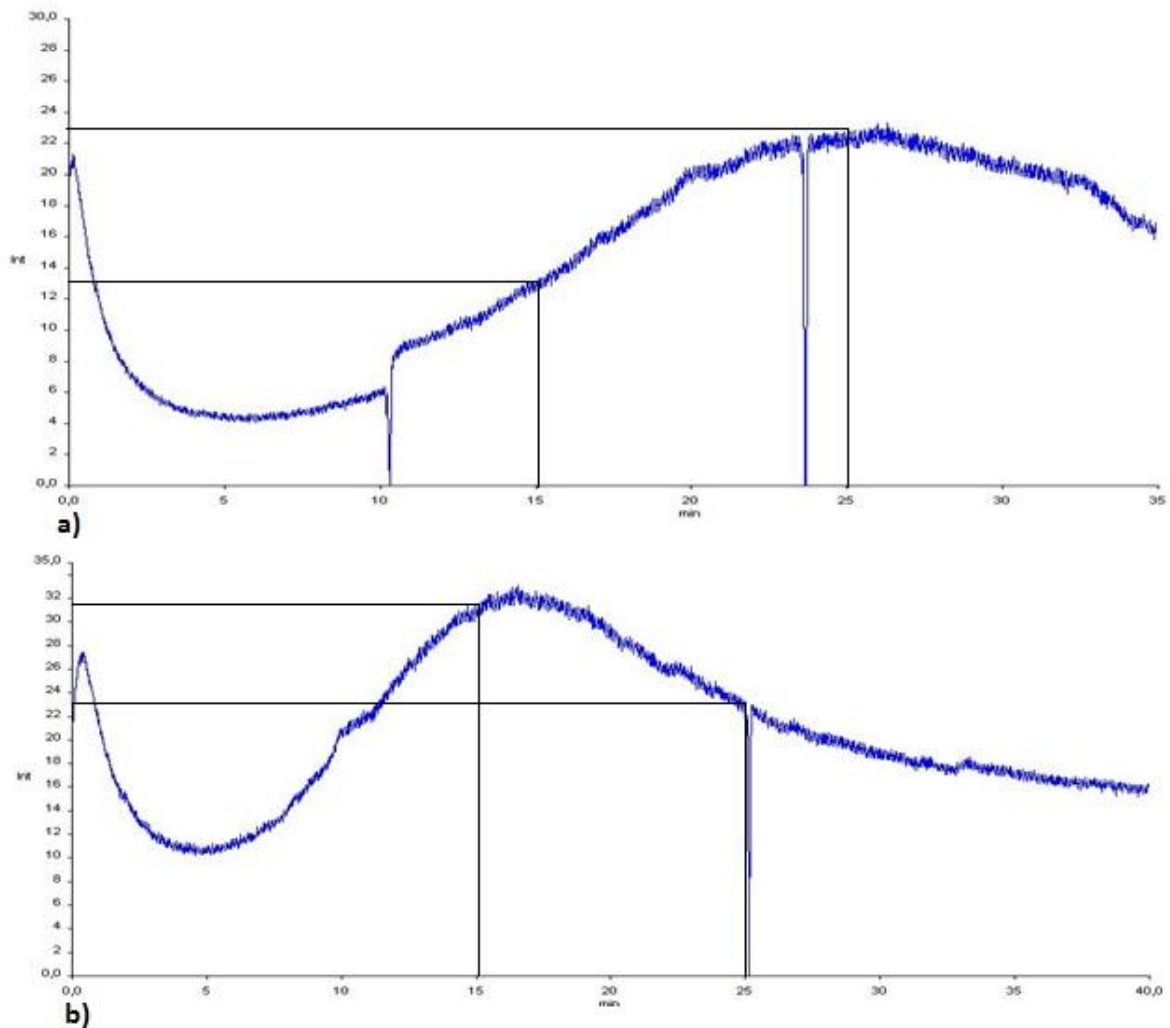


Figur 18: Forholdet mellom spesifikt lipidinnhold målt ved hjelp av NR, og gravimetrisk bestemmelse etter lipidekstraksjon for oppskalert kultur M.

Figur 17 viser at det faktiske lipidinnholdet var 2,4 ganger så høyt som det som ble målt ved hjelp av NR for oppskalert kultur D, og at det var en lineær sammenheng mellom de to målemetodene. Resultatet fra kultur M (se Figur 18) gjenspeiler ikke resultatet fra kultur D.

3.6 Sammenligning av NR-signaler etter 15 og 25 minutters innfargingstid

Tidsscann av fluorescenssignalet fra *Isochrysis T-iso* etter tilsats av NR ble utført på to steder i vekstfasen for å finne optimal innfargingstid, og for å undersøke om denne endret seg i løpet av algens vekstfaser.



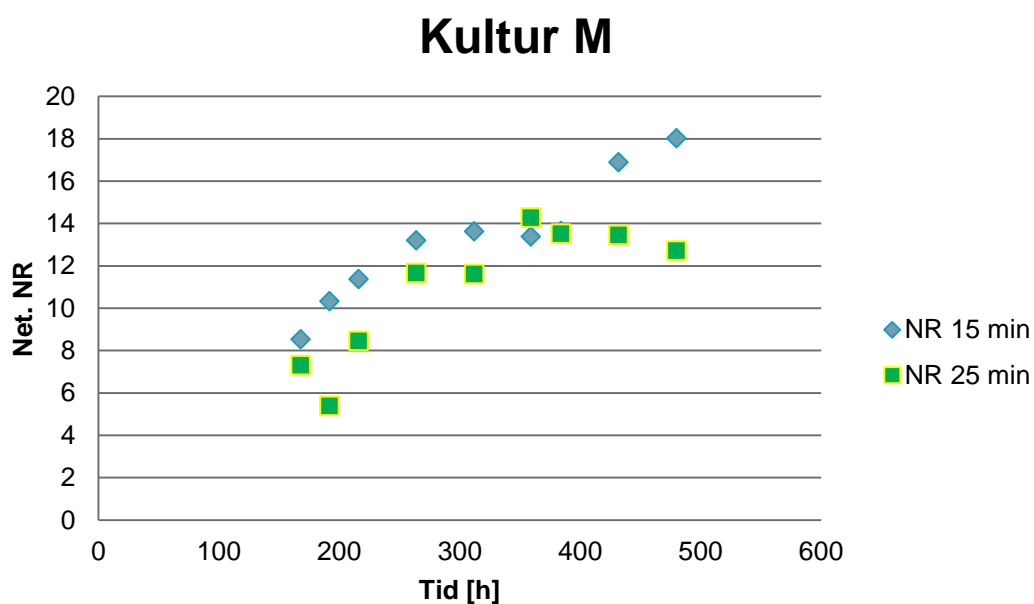
Figur 19: Tidsscann for *Isochrysis T-iso*. a) viser tidsscann fra en kultur i tidlig stasjonær fase farget med NR. b) viser tidsscann fra samme kultur i sen stasjonær fase farget med NR. NR ble tilsatt ved 0 min, og eksitasjon og emisjon målt ved henholdsvis 530 og 575 nm.

Figur 19 a) viser at maksimalt fluorescens signal for kultur i tidlig stasjonær fase ble oppnådd etter en inkuberingstid på ca. 25 minutter. Etter 15 minutter var signalet 57 % av det maksimalt oppnådde signalet. Figur 19 b) viser at maksimalt fluorescens signal for kultur i sen stasjonær fase ble oppnådd etter en inkuberingstid på ca. 15 minutter. Etter 25 minutter var signalet 74 % av det maksimalt oppnådde signalet. Disse resultatene er oppsummert i Tabell 4.

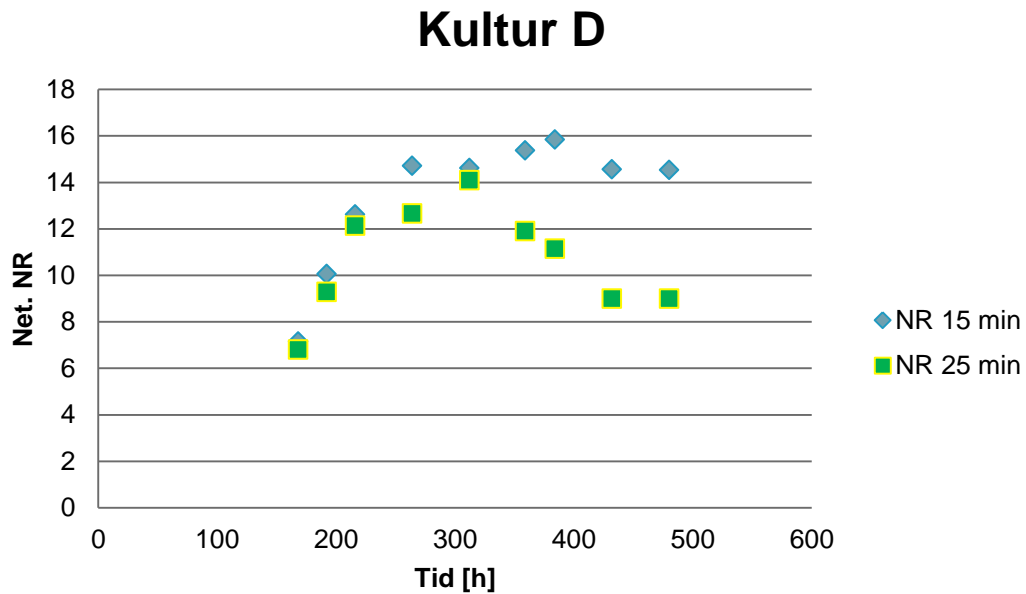
Tabell 4: Oppsummering av resultater fra tidsscann

Vekstfase	Maksimalt signal	Signal etter 15 min [% av maks]	Signal etter 25 min [% av maks]
Tidlig stasjonær	23	57	100
Sen stasjonær	33	100	74

For sammenligning mellom de to forskjellige innfargingstidene for NR, ble det tatt utgangspunkt i målingene fra de to oppskalerte kulturene M og D. Figur 20 og Figur 21 viser netto NR signal målt etter 15 og 25 min for henholdsvis kultur M og D.



Figur 20: Netto NR signal for kultur M målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



Figur 21: Netto NR signal for kultur M målt etter 15 og 25 min innfargingstid.

Tabell 5 viser den gjennomsnittlige verdien til NR-signalene målt etter 15 og 25 min innfargingstid for de to kulturene fra de siste 100-150 timene.

Tabell 5: Gjennomsnittlig NR-verdi etter 15 og 25 min innfargingstid for de to oppskalerte kulturene M og D fra de siste 100-150 timene.

Kultur	M	D
$NR_{15\ min}$	$16,2 \pm 1,3$	$15,1 \pm 0,3$
$NR_{25\ min}$	$13,3 \pm 0,3$	$10,3 \pm 0,8$

Tabellen viser at det var en signifikant forskjell innenfor et 95 % konfidensintervall ($p < 0,05$) mellom målingene etter 15 og 25 min innfargingstid for kultur D. For kultur M var forskjellen kun signifikant innenfor et 90 % konfidensintervall ($p < 0,1$).

4. Diskusjon

4.1 Metodisk evaluering

Feilkilder og usikkerhet

Det er flere kilder til usikkerhet i forsøkene i denne oppgaven. En kilde til potensiell stor usikkerhet er at algekulturene i de forskjellige forsøkene ikke ble holdt sterile, og ingen analyser ble gjennomført for å undersøke om noen av kulturene var kontaminerte. Dette kan ha medført en overestimering av biomasseinnhold i kulturene og dermed underestimering av spesifikke lipidinnhold ved at kontaminerende organismer bidrar til biomasse, men ikke lipider. Et annet resultat av kontaminering kan være at organismer som utkonkurrerer *Isochrysis T-iso* forstyrrer forsøket så mye at det totalt undergraver eller dekker over resultatene. Kulturene ble dyrket i lysskap sammen med andre mikroalger som kan ha vært kilder til mulig kontaminering.

Resultatene har også den svakheten at de for de fleste forsøkene ikke ble gjennomført flere paralleller. De bør derfor etterprøves før de kan regnes som konklusive, men den relativt gode reproducerbarheten av tidligere forsøk (se kapittel 3.2) undersøkt i denne oppgaven øker tilliten til validiteten av resultatene.

Forskjell i optimal innfargingstid

Tidsscann utført på kulturer i forskjellige deler av stasjonær fase (tidlig stasjonær og sen stasjonær fase) indikerte at optimal innfargingstid for NR i kulturer av *Isochrysis T-iso* endret seg i løpet av vekstfasen. Optimal tid ble målt til 25 min i tidlig stasjonær fase og 15 min i sen stasjonær fase. For både kultur D og M (se kapittel 3.6) hvor målinger ble utført ved begge innfargingstidene var NR-signalet målt etter 25 min var lavere enn etter 15 min i sen stasjonær fase, men denne forskjellen var bare signifikant innenfor et 95 % konfidensintervall for en av kulturene. Videre viste forsøkene ingen antydning til at målinger utført etter 25 min i tidlig stasjonær fase gav høyere NR-signal enn etter 15 min. De andre kulturene hvor det ble utført målinger etter både 15 og 25 min (se Vedlegg B) viste ingen klar indikasjon på noen konsistent forskjell mellom de to innfargingstidene. Resultatene ved videre undersøkelse av

forskjellig innfargingstid klarte dermed ikke å bekrefte fenomenet indikert av tidsscann ved forskjellige deler av stasjonær vekstfase.

Sammenligning av lipidinnhold målt ved hjelp av Nile Red og gravimetrisk bestemmelse

Resultatene fra triolein fortynningskurven ble brukt til å overføre de relative verdiene fra NR-signalene til fysiske størrelser. Denne metoden gir kun et estimat for det faktiske lipidinnholdet. Sammenlignet med resultatene funnet i kapittel 3.5 gav fortynningskurven et grovt underestimat av det faktiske lipidinnholdet, funnet ved gravimetrisk determinering. Figur 16 i kapittel 3.5 viser at det gravimetrisk bestemte lipidinnholdet tilsynelatende var 2,4 ganger så høyt som det målt ved hjelp av NR. Etersom den gravimetriske bestemmelsen baserer seg på å ekstrahere lipidene fra cellene mens NR metoden baserer seg på å farge lipidene i cellene og måle fluorescenssignalet, vil det være mer usikkerhet knyttet til NR metoden siden det ikke er noen måte å vite om hele lipidinnholdet har blitt farget. En årsak til den store differansen mellom de to måle metodene kan ligge i at det var det totale lipidinnholdet som ble funnet ved gravimetrisk bestemmelse, mens kun de nøytrale lipidene ble målt ved hjelp av NR. Siden lagringslipidene er nøytrale, og det var disse som akkumuleres i celle over tid, vil de representere den største andelen av det totale lipidinnholdet. Det er dermed rimelig å anta at det faktiske innholdet av nøytrale lipider var noe lavere enn det totale lipidinnholdet som ble målt gravimetrisk. Fidalgo et al. (1998) viste at andelen nøytrale lipider i *Isochrysis galbana* var ca. 60 % i sen stasjonær fase når nitrat (NaNO_3) ble brukt som N-kilde (samme som ble brukt i denne oppgaven). Dette resultatet ble oppnådd uten N-begrensning, så det er rimelig å anta at andelen nøytrale lipider var betydelig høyere i kulturrene i denne oppgaven. Siden andelen nøytrale lipider ikke ble målt, ble det antatt at innholdet nøytrale lipider ble representert av de gravimetriske målingene (2,4 ganger høyere enn NR-målingene), med forbehold om at denne verdien var en overestimering.

Det betydelig høyere lipidinnholdet målt gravimetrisk i forhold til det målt ved hjelp av NR, skiller deg fra resultater fra andre forsøk. Chen et al. (2009) viste at gravimetrisk bestemmelse av nøytrale lipider og bestemmelse ved hjelp av NR gav tilnærmet samme verdier for mikroalgen *C. Vulgaris*. Denne forskjellen kan være et resultat av at presisjonen av lipidmålinger ved hjelp av NR ser ut til å variere mellom arter, eller at det opprinnelige estimatet av fraksjonen nøytrale lipider i det totale lipidinnholdet bestemt gravimetrisk var overvurdert.

Figur 17 viser at det var et lineært forhold mellom lipidinnhold bestemt gravimetrisk og lipidinnhold bestemt ved hjelp av NR for den oppskalerte kulturen D. Dette medfører at NR målingene fortsatt har verdi som sammenligningsgrunnlag, men for kvantitative verdier av lipidinnhold bør resultatene funnet ved gravimetrisk bestemmelse brukes. Det lineære forholdet mellom gravimetrisk lipidbestemmelse og NR funnet i oppskalert kultur D (se Figur 17) ble ikke gjenspeilet i oppskalert kultur M (se Figur 18). En årsak til dette kan være den lave differansen mellom målingsverdiene (største differanse mellom de målte verdiene i kultur M var 0,012 g lipid/g dw). Etersom det var så lav differanse mellom de målte verdiene kan støy i målingene ha hatt stor nok påvirkning til å overskygge det faktiske forholdet mellom gravimetrisk målt lipidinnhold og lipidinnhold målt ved hjelp av NR for oppskalert kultur M.

4.2 Biomasseutvikling og veksthastighet

Den maksimale oppnådde biomassen for de forskjellige kulturene var ikke så konsistent som forventet med tanke på at alle kulturene ble dyrket opp under like forhold. En mulig forklaring på denne variasjonen kan være at noen av kulturene ble kontaminert under forsøket. En mulig kontamineringskilde kan ha vært andre mikroalger som ble oppbevart i samme lysskap, og som viste antydninger til betydelig høyere maksimal biomasseutvikling under samme N-begrensning enn mikroalgen som ble brukt under forsøkene utført i denne oppgaven. En annen årsak kan ha vært forskjellig innhold av nitrogen i mediet til de forskjellige kulturene grunnet f. eks. pipetteringsfeil når nitrogen ble tilsatt, men dette virker lite sannsynlig ettersom forskjellene i gjennomsnittlig maksimal biomasse var på opptil 80 %, som er betydelig mer enn det som rimelig kan antas å resultere fra pipetteringsfeil. Samme stockløsning ble brukt til produksjon av sjøvannsmedium under alle forsøkene, så dette kan ikke ha påvirket nitrogeninnholdet.

Kulturene dyrket under høyere lysintensitet sammenlignet med kulturene i Sæther (2012) viste en antydning til å oppnå høyere maksimal biomasse, men at kulturen også gikk over i dødsfasen fortere (se Figur 8 og Figur 9). Dette kan tyde på at den økte lysintensiteten påvirket veksten av mikroalgen selv om den tilsynelatende ikke påvirket lipidakkumuleringen.

Veksthastigheten i de lyssultede kulturene under N-begrensning var tilsynelatende noe lavere i enn i moderkulturen, men forskjellene var ikke signifikante innenfor et 95 % konfidensintervall. En årsak til at den tilsynelatende forskjellen ikke var signifikant, var at det ikke ble utført tilstrekkelig mange målinger i løpet av den eksponentielle vekstfasen. Dette medfører at målingene har liten eller ingen verdi når det gjelder å undersøke om det var noe trade off mellom lipidakkumulering og maksimal veksthastighet. Tidligere forskning har vist at det er trade off mellom lipidakkumulering og veksthastighet ved at kulturer dyrket under N-begrensning har høyere lipidinnhold, men betydelig redusert veksthastighet (Rodolfi et al., 2009, Mazzuca Sobczuk and Chisti, 2010).

4.3 Spesifikt lipidinnhold

Verdiene for spesifikt lipidinnhold vist i kapittel 3 inkluderer ikke verdier målt etter at biomassen i kulturen falt under ca. 10 % av den maksimale verdien. Dette ble gjort fordi både målinger av biomasse og lipidinnhold på dette punktet vil inneha en høy usikkerhet, ettersom døde celler sannsynligvis vil representere en betydelig andel av de målte verdiene.

Fra resultatene presentert i kapittel 3.3 og i Sæther (2012) er det tydelig at lyssulting under N-begrensning har potensialet å øke det spesifikke lipidinnholdet mikroalger, og at videre økning kan oppnås ved å gjenta prosessen. Det noe dårligere resultatet fra kulturen som ble tatt ut etter en forlenget periode i mørket (D,3) kan forklares med at en for stor andel av cellene i den mørkeinkuberte kulturen hadde dødd ut på tidspunktet prøven til inokulering av kultur D,3 ble tatt ut. Videre tyder dette på at lengden på lyssulteperioden er en vesentlig faktor for suksessen til økning av spesifikt lipidinnhold ved hjelp av denne prosessen.

Det maksimale spesifikke lipidinnholdet oppnådd ved hjelp av lyssulting under N-begrensning ble målt i kultur D,2 etter at denne hadde vært gjennom to runder med seleksjon (lyssulting) under N-begrensning. Det maksimale spesifikke lipidinnholdet i denne kulturen var $0,170 \pm 0,006$ trioleinekvivalenter/dw [g/g], funnet ved hjelp av farging med NR. Dette representerer en økning på 63 % i forhold til referansekulturen D,1 som tidligere hadde vært gjennom en runde med lyssulting under N-begrensning. Den første runden med lyssulting under N-begrensning D,1 hadde vært gjennom ble utført av Sæther (2012), og resulterte i en 20 % økning av spesifikt lipidinnhold. Ettersom resultatene i kapittel 3.5 (Figur 17) (diskutert i kapittel 4.1) tydet på at det faktiske lipidinnholdet var 2,4 ganger høyere enn det målt ved hjelp av NR, antas det reelle innholdet å være $0,408 \pm 0,015$ lipid/dw [g/g]. Lignende

resultater ble funnet av Gouveia and Oliveira (2009) som oppnådde en 50 % økning i lipidinnhold ved å dyrke *Nannochloropsis sp.* under N-begrensning.

For å øke den økonomiske lønnsomheten ved produksjon av biodiesel fra alger er det nødvendig med rasktvoksende mikroalger som har høyt lipidinnhold. Resultatene fra forsøk utført i denne oppgaven tyder på at det er mulig å øke det spesifikke lipidinnholdet i mikroalger med over 60 % ved å utsette de for N-begrensning og selektere ut de cellene i en kultur som har best lipidlagringskapasitet ved å skape en genetisk flaskehals gjennom lyssulting av mikroalgene. Gjentatt seleksjon på denne måten ble i denne oppgaven vist å kunne øke det spesifikke lipidutbyttet ytterligere ved at kun de cellene med høyest lipidlagringskapasitet fra hver lyssultesyklus overlever. Det ble ikke observert noe signifikant endring av maksimal veksthastighet som følge av det økte spesifikke lipidutbyttet, men det var lite fokus på å undersøke dette i denne oppgaven.

4.4 Reproduserbarhet

I forhold til tidligere forsøk

Resultatene funnet i Sæther (2012) ble forsøk gjenskapt ved å gjenta forsøkene. Den eneste markante forskjellen mellom utførelsen av forsøkene var en noe høyere lysintensitet i denne oppgave i forhold til de tidligere forsøkene. Denne forskjellen hadde tilsynelatende liten eller ingen effekt akkumulering av lipider, ettersom resultatene fra Sæther (2012) ble replikert med tilnærmet samme resultat (se Figur 10 og Figur 11). Dette underbygger validiteten av resultatene og viser en antydning til at effekten av den økte lysintensiteten på det spesifikke lipidinnholdet var minimal. Effekten av en betydelig økning i lysintensitet ble ikke undersøkt i denne oppgaven. Dette resultatet antyder at en genetisk flaskehalseffekt kan gjenskapes med relativt konsistent resultat.

I forhold til oppskalering

I kapittel 3.4 ble det undersøkt om økningen av det spesifikke lipidinnholdet oppnådd ved hjelp av mørkeinkubering under N-begrensning fortsatt ville være gjeldene under oppskalerte forhold. Figur 15 viser at kulturen som hadde blitt utsatt for to runder med lyssulting under N-

begrensning (kultur D) oppnådde et 63 % høyere spesifikt lipidutbytte enn kulturen som ikke hadde blitt utsatt for lyssulting, under oppskalerte forhold. Denne differansen er like stor som differansen mellom kulturen som var blitt utsatt for en runde med lyssulting under N-begrensning (kultur D,1) og den som var blitt utsatt for to runder med lyssulting under N-begrensning (kultur D,2), se kapittel 3.3. Dette tyder på at det høyere spesifikke lipidutbyttet oppnådd gjennom lyssulting under N-begrensning ble bevart under oppskalerte forhold.

4.5 Videre utfordringer

For å undersøke om resultatene kommet frem til i denne oppgaven kan benyttes i forbindelse med produksjon av biodiesel vil det være nødvendig å foreta videre undersøkelser vedrørende effekten den oppnådde økningen i det spesifikke lipidinnholdet har på andre faktorer som f. eks. maksimal oppnåelig biomassekonsentrasjon og veksthastighet. Siden det ønskede resultatet er en mikroalge som gir maksimalt lipidutbytte fra et gitt volum så raskt som mulig vil det være nødvendig å finne en måte å maksimere alle disse faktorene samtidig for å kunne oppnå økonomisk lønnsomhet for biodieselproduksjon fra mikroalger.

Utfordringene som har blitt forsøkt løst i denne oppgaven er bare en liten del av det som må oppnås for at lønnsom produksjon av biodiesel fra mikroalger skal bli en realitet. Det vil være nødvendig å finne en løsning hvor biodiesel ikke er det eneste salgsproduktet som utvinnes, ettersom produksjon av biodiesel alene ikke er nok til å oppnå økonomisk lønnsomhet. Her finnes det flere muligheter som f. eks. salg av biomasse som dyrefôr etter ekstraksjon av lipider, eller produksjon av høyverdige biprodukter (Williams and Laurens, 2010). Lønnsomheten er også direkte knyttet til oljepriser og etterspørsel etter mer miljøvennlige alternativer til fossilt drivstoff. En stor del av kostnadene knyttet til produksjonen av biodiesel fra mikroalger ligger i nedstrømsprosessen, så mer forskning på høsting og prosessering er også nødvendig (Greenwell et al., 2010, Kirrolia et al., 2013). Alt i alt vil det kreve mye forskning innenfor mange forskjellige fagfelt før økonomisk lønnsom produksjon av biodiesel fra mikroalger blir en realitet.

5. Konklusjon

- Gjentatt lyssulting under N-begrensning (totalt to runder) førte et maksimalt spesifikt lipidinnhold på $0,408 \pm 0,015$ lipid/dw [g/g] i mikroalgen *Isochrysis T-iso*. Dette representerte en økning på 63 % i forhold til referansekulturen som bare hadde vært gjennom en runde med lyssulting under N-begrensning.
- Test av reproduserbarheten til forsøket viste at resultatene fra tidligere forsøk (Sæther, 2012) lot seg reproducere uten store vanskeligheter, og at disse ble gjenspeilet når kulturene ble overført til en større skala.
- Lipidmålinger utført ved hjelp av NR ble vist å gi en grov underestimering av det faktiske lipidinnholdet, ved at gravimetrisk analyse av ekstraherte lipider gav verdier for lipidinnhold som var 2,4 ganger høyere enn det målt ved hjelp av NR. Forholdet mellom NR målingene og de gravimetriske ble vist å være lineært i området hvor målingene ble utført.
- Optimal innfargingstid for NR ble først vist å være forskjellig i tidlig og sen stasjonær vekstfase, henholdsvis 25 og 15 minutter. Videre undersøkelse av dette fenomenet gav ingen konklusive resultater, men det ble funnet resultater som indikerer at målinger utført etter 25 minutter er noe lavere enn målinger utført etter 15 minutter i sen stasjonær fase for mikroalgen *Isochrysis T-iso*.

6. Referanser

- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37, 911-917.
- CHEN, W., ZHANG, C., SONG, L., SOMMERFELD, M. & HU, Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods*, 77, 41-47.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- DEMIRBAS, A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, 86, Supplement 1, S108-S117.
- DEMIRBAS, A. 2011. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*, 88, 3541-3547.
- DEMIRBAS, A. & FATIH DEMIRBAS, M. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52, 163-170.
- DOAN, T. T. Y. & OBBARD, J. P. 2012. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Research*, 1, 17-21.
- FIDALGO, J. P., CID, A., TORRES, E., SUKENIK, A. & HERRERO, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166, 105-116.
- GERBENS-LEENES, W., HOEKSTRA, A. Y. & VAN DER MEER, T. H. 2009. The water footprint of bioenergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10219-10223.
- GOUVEIA, L. & OLIVEIRA, A. C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36, 269-274.
- GREENWELL, H., LAURENS, L., SHIELDS, R., LOVITT, R. & FLYNN, K. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, 703-726.
- GUILLARD, R. L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. & CHANLEY, M. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. & RYAN, P. D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4, 9.

- KIRROLIA, A., BISHNOI, N. R. & SINGH, R. 2013. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20, 642-656.
- MAZZUCA SOBCZUK, T. & CHISTI, Y. 2010. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 100-108.
- RODOLFI, L., CHINI ZITTELLI, G., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G. & TREDICI, M. R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112.
- SHEEHAN, J., DUNAHAY, T., BENEMANN, J. & ROESSLER, P. 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species. *Close-Out Report National Renewable Energy Laboratory, US Department of Energy's Office of Fuels Development, Golden, Colorado, USA*.
- SINGH, A., NIGAM, P. S. & MURPHY, J. D. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102, 10-16.
- SITEPU, I., IGNATIA, L., FRANZ, A., WONG, D., FAULINA, S., TSUI, M., KANTI, A. & BOUNDY-MILLS, K. 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of Microbiological Methods*.
- SUKENIK, A. & WAHNON, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97, 61-72.
- SÆTHER, R. M. 2012. Bruk av selektive dyrkningsstrategier for å øke spesifikt lipidinnhold i mikroalger, for produksjon av biodiesel. Institutt for bioteknologi, NTNU.
- WILLIAMS, P. J. L. B. & LAURENS, L. M. L. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy and Environmental Science*, 3, 554-590.

1. Lysskap:

Termaks KB 8400 L

230 V 50/56 Hz 1200 W

Temperatur: 20 °C

Lysintensitet: 100 – 150 $\mu\text{mol}/\text{sm}^2$

2. Spektrofotometer:

HITACHI U-5100

3. Fluorometer:

1. Aquafluor 8000-010

Eksitasjonsbølgelengde: 525 nm

Emisjonsbølgelengde: 575 nm

2. Aquapen AP-100

4. Spektrofluorometer:

Perkin Elmer

Luminescence Spectrometer

LS 50 B

5. Sentrifuge:

Sorvall Instruments RC5C

SS-34 rotor

Hastighet: 8000 rpm

RCF: 7600 g

Tid: 10 min

Temperatur: 18-25 °C

1. Generelle beregninger og fremstilling av grafisk materiale:

Microsoft Excel 2010

2. Beregning av usikkerhet og statistiske analyser:

PAST (PAleontological STatistics) 1999-2012

Verson 2.17

Vedlegg B

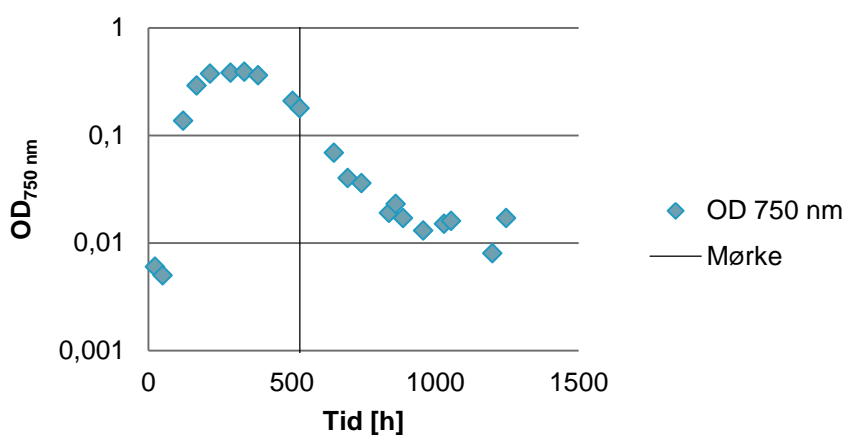
Tabell B. 1 til Tabell B. 8 viser rådata for alle kulturene som ble dyrket opp i denne oppgaven. Figur B. 1 til Figur B. 16 viser de ubearbeidede dataene for biomasse- og lipidutvikling for de samme kulturene.

Rådata for kultur M,0

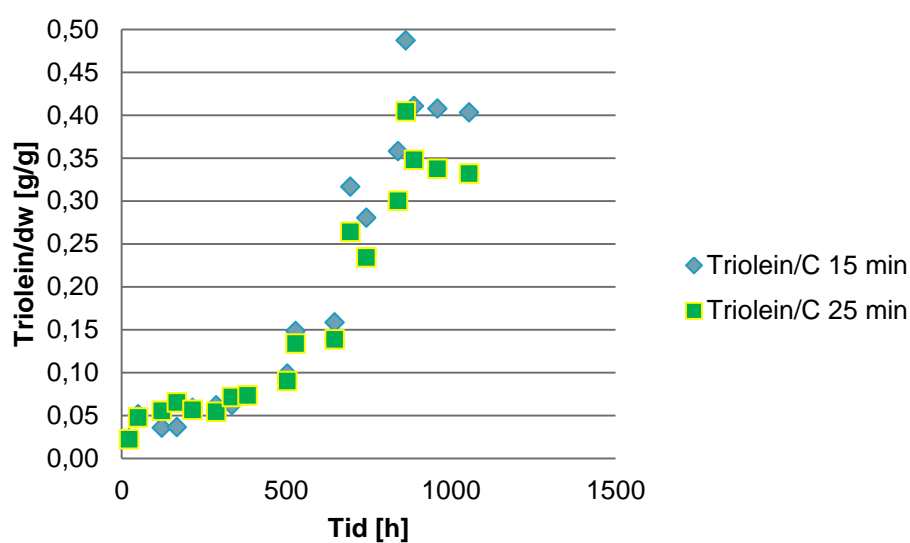
Tabell B. 1: Rådata for moderkultur M,0

<i>OD</i> ₇₅₀	<i>QY</i>	<i>NR</i> _{ref}	<i>NR</i> _{15 min}	<i>NR</i> _{25 min}	<i>Net. NR</i> _{15 min}	<i>Net. NR</i> _{25 min}	<i>NR</i> _{15 min} / <i>OD</i>	<i>NR</i> _{25 min} / <i>OD</i>	<i>Tid</i> [timer]
0,006	0,62	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	23
0,005	0,66	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	50
0,136	0,68	0,074	1,071	1,013	0,997	0,939	7,331	6,904	122
0,290	0,58	0,103	4,758	4,410	4,655	4,307	16,052	14,852	168
0,374	0,43	0,118	4,282	6,607	4,164	6,489	11,134	17,350	215
0,380	0,37	0,126	4,443	7,896	4,317	7,770	11,361	20,447	287
0,390	0,33	0,123	7,313	7,036	7,190	6,913	18,436	17,726	335
0,362	0,35	0,129	7,142	6,276	7,013	6,147	19,373	16,981	383
0,209	0,38	0,109	4,172	4,797	4,063	4,688	19,440	22,431	503
0,178	N/A	0,094	4,173	4,181	4,079	4,087	22,916	22,961	528
Kultur overført til mørke									
0,069	N/A	0,076	2,210	2,021	2,134	1,945	30,928	28,188	647
0,040	0,69	0,077	1,939	1,753	1,862	1,676	46,550	41,900	695
0,036	0,71	0,063	1,853	1,630	1,790	1,567	49,722	43,528	743
0,019	0,72	0,069	1,956	1,644	1,887	1,575	99,316	82,895	839
0,023	0,74	0,053	2,076	1,742	2,023	1,689	87,957	73,435	863
0,017	0,74	0,061	1,971	1,662	1,910	1,601	112,353	94,176	888
0,013	0,74	0,065	2,053	1,714	1,988	1,649	152,923	126,846	959
0,015	0,69	0,079	2,013	1,717	1,934	1,638	128,933	109,200	1031
0,016	0,73	0,060	2,108	1,754	2,048	1,694	128,000	105,875	1055
0,008	0,73	0,059	2,154	1,800	2,095	1,741	261,875	217,625	1199
0,017	0,74	0,072	2,223	1,842	2,151	1,770	126,529	104,118	1247

Figur B. 1: Utvikling av biomasse for kultur M,0 på semilogaritmisk skala.



Figur B. 2: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur M,0 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



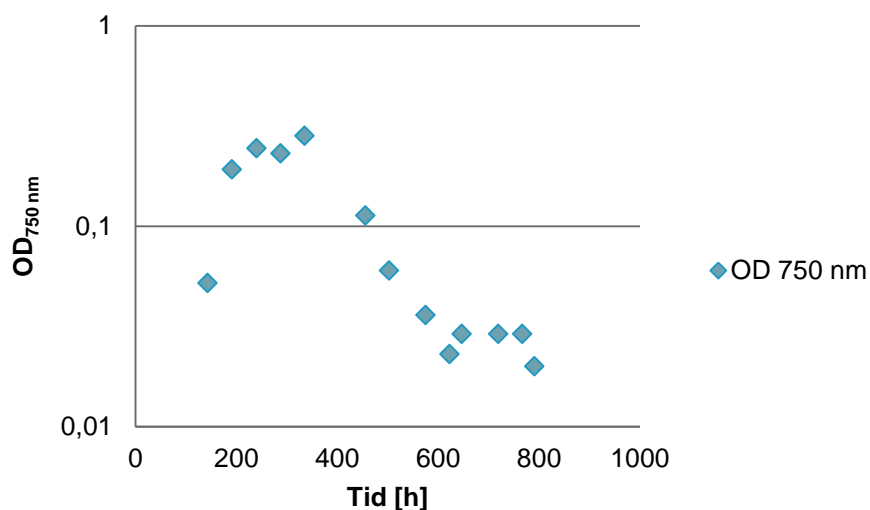
Rådata for kultur M,1

Tabell B. 2: Rådata for kultur M,1

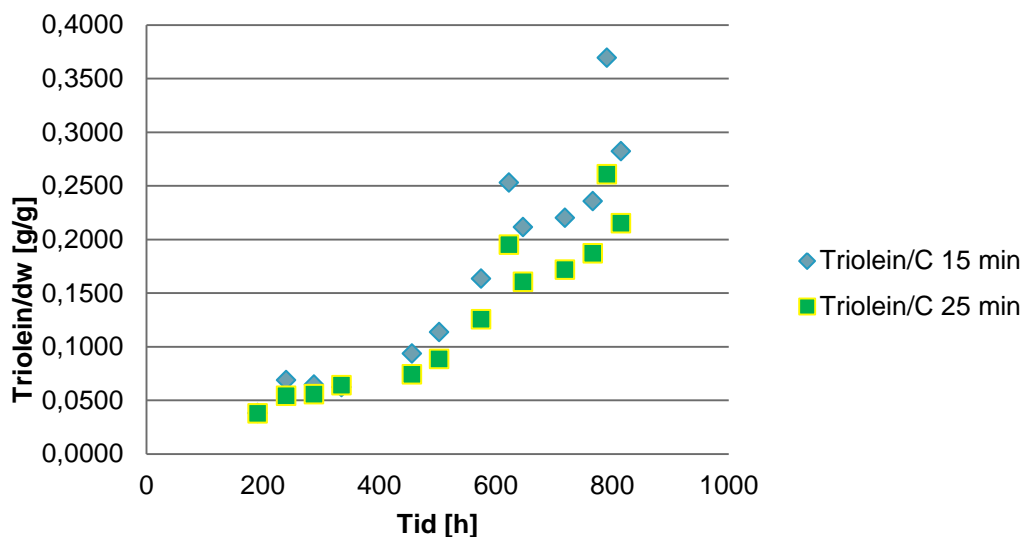
OD_{750}	QY	NR_{ref}	$NR_{15\ min}$	$NR_{25\ min}$	$Net. NR_{15\ min}$	$Net. NR_{25\ min}$	$NR_{15\ min}/OD$	$NR_{25\ min}/OD$	Tid [timer]
0,052	0,68								143
0,192	0,66	0,082	2,374	2,351	2,292	2,269	11,938	11,818	191
0,245	0,49	0,087	5,371	4,241	5,284	4,154	21,567	16,955	240
0,231	0,36	0,093	4,774	4,120	4,681	4,027	20,264	17,433	288
0,282	0,37	0,110	5,610	5,776	5,500	5,666	19,504	20,092	335
0,113	0,37	0,060	3,377	2,684	3,317	2,624	29,354	23,221	456
0,060	0,49	0,071	2,210	1,737	2,139	1,666	35,650	27,767	503
0,036	0,46	0,066	1,912	1,485	1,846	1,419	51,278	39,417	575

0,023	Low	0,041	1,868	1,449	1,827	1,408	79,435	61,217	623
0,029	Low	0,061	1,987	1,521	1,926	1,460	66,414	50,345	647
0,029	Low	0,068	2,071	1,630	2,003	1,562	69,069	53,862	719
0,029	Low	0,054	2,199	1,756	2,145	1,702	73,966	58,690	767
0,020	Low	0,053	2,372	1,690	2,319	1,637	115,950	81,850	791
0,024	Low	0,066	2,191	1,685	2,125	1,619	88,542	67,458	815

Figur B. 3: Utvikling av biomasse for kultur M,1 på semilogaritmisk skala.



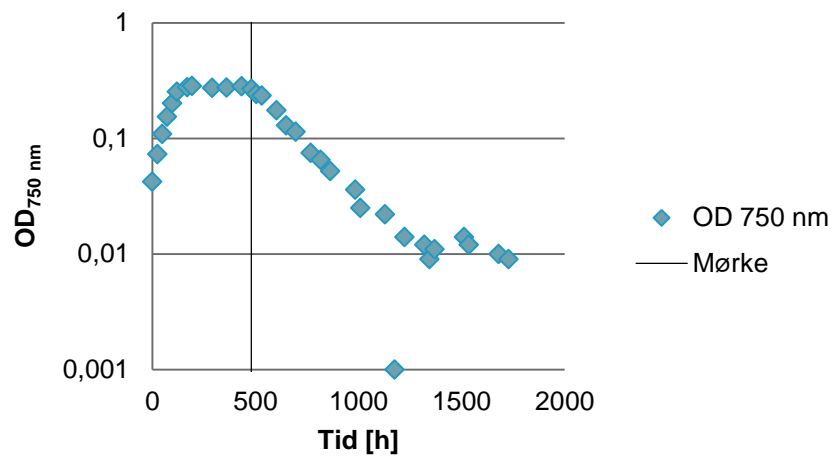
Figur B. 4: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur M,1 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



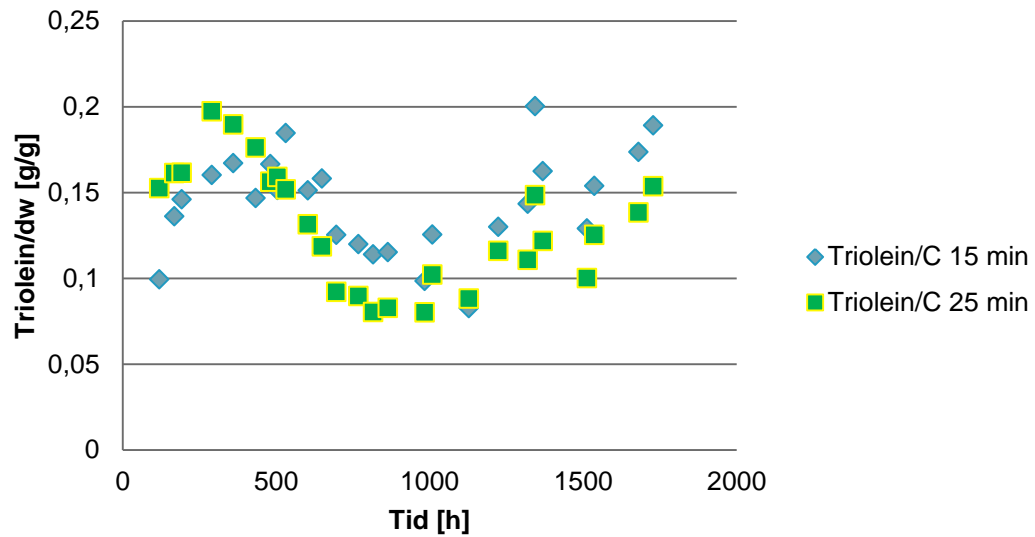
Tabell B. 3: Rådata for referansekultur D,0

<i>OD</i> ₇₅₀	<i>QY</i>	<i>NR</i> _{ref}	<i>NR</i> _{15 min}	<i>NR</i> _{25 min}	<i>Net. NR</i> _{15 min}	<i>Net. NR</i> _{25 min}	<i>NR</i> _{15 min} / <i>OD</i>	<i>NR</i> _{25 min} / <i>OD</i>	<i>Tid</i> [timer]
0,042	0,62								0
0,073	0,66								24
0,109	0,65								48
0,154	0,59								72
0,201	0,52								96
0,252	0,47	0,085	7,936	12,15	7,851	12,065	31,155	47,877	120
0,277	0,43	0,102	11,930	14,13	11,828	14,028	42,700	50,643	169
0,283	0,42	0,100	13,07	14,44	12,970	14,34	45,830	50,671	193
0,272	0,34	0,099	13,77	16,95	13,671	16,851	50,261	61,952	290
0,274	0,32	0,128	14,5	16,43	14,372	16,302	52,453	59,496	360
0,281	0,31	0,117	13,06	15,66	12,943	15,543	46,060	55,313	433
0,267	0,27	0,119	14,07	13,21	13,951	13,091	52,251	49,030	481
Kultur overført til mørke									
0,242	0,29	0,119	11,62	12,20	11,501	12,081	47,525	49,921	504
0,234	0,36	0,125	13,69	11,27	13,565	11,145	57,970	47,628	531
0,174	0,41	0,103	8,364	7,285	8,261	7,182	47,477	41,276	603
0,129	0,38	0,089	6,487	4,885	6,398	4,796	49,597	37,178	649
0,114	0,40	0,090	4,571	3,381	4,481	3,291	39,307	28,868	696
0,075	0,43	0,078	2,898	2,189	2,820	2,111	37,600	28,147	768
0,065	0,47	0,067	2,391	1,703	2,324	1,636	35,754	25,169	816
0,052	0,44	0,071	1,951	1,420	1,880	1,349	36,154	25,942	864
0,036	0,47	0,071	1,183	0,975	1,112	0,904	30,889	25,111	984
0,025	N/A	0,070	1,054	0,871	0,984	0,801	39,360	32,040	1009
0,022	N/A	0,062	0,632	0,670	0,570	0,608	25,909	27,636	1128
0,001	0,34	0,057	0,563	0,610	0,506	0,553	506,000	553,000	1176
0,014	0,32	0,083	0,654	0,592	0,571	0,509	40,786	36,357	1224
0,012	0,32	0,070	0,610	0,487	0,540	0,417	45,000	34,750	1320
0,009	0,31	0,058	0,624	0,477	0,566	0,419	62,889	46,556	1344
0,011	0,27	0,072	0,633	0,492	0,561	0,42	51,000	38,182	1369
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1440
0,014	0,29	0,065	0,632	0,505	0,567	0,440	40,500	31,429	1512
0,012	0,20	0,062	0,641	0,534	0,579	0,472	48,250	39,333	1536
0,010	0,09	0,073	0,618	0,507	0,545	0,434	54,500	43,400	1680
0,009	0,18	0,050	0,584	0,484	0,534	0,434	59,333	48,222	1728

Figur B. 5: Utvikling av biomasse for kultur D,0 på semilogaritmisk skala.



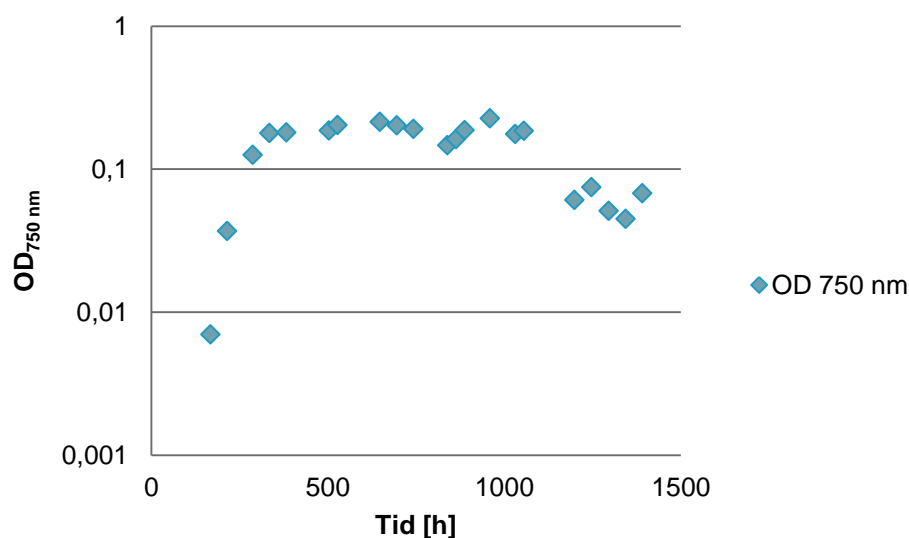
Figur B. 6: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur D,0 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



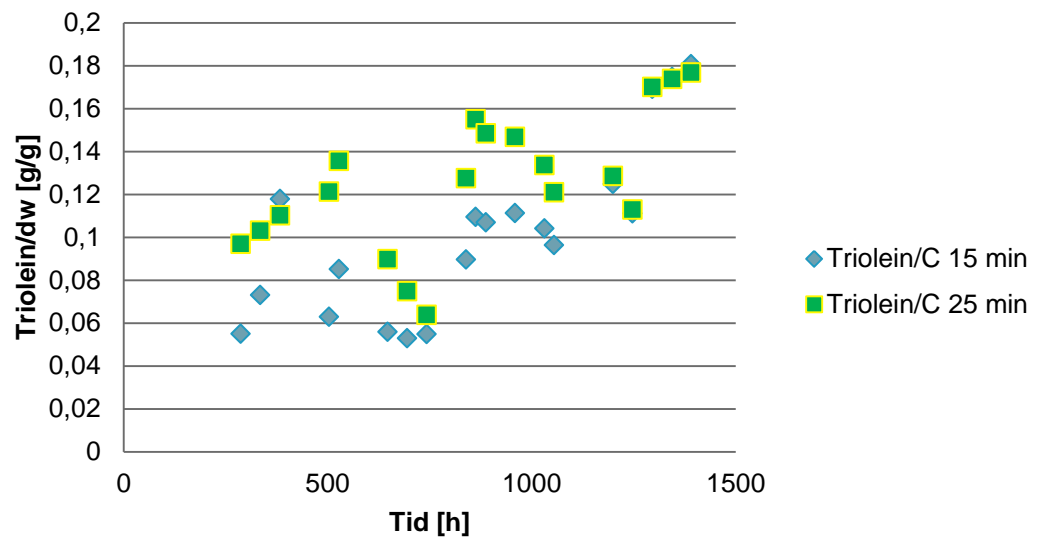
Tabell B. 4: Rådata for referansekultur D,1

OD_{750}	QY	NR_{ref}	$NR_{15\ min}$	$NR_{25\ min}$	Net. $NR_{15\ min}$	Net. $NR_{25\ min}$	$NR_{15\ min}/OD$	$NR_{25\ min}/OD$	Tid [timer]
0,007	0,66								168
0,037	0,66								215
0,126	0,63	0,065	2,238	3,900	2,173	3,835	17,246	30,437	287
0,179	0,48	0,085	4,188	5,876	4,103	5,791	22,922	32,352	335
0,181	0,45	0,083	6,775	6,343	6,692	6,260	36,972	34,586	383
0,186	0,37	0,115	3,782	7,190	3,667	7,075	19,715	38,038	503
0,204	N/A	0,113	5,564	8,796	5,451	8,683	26,721	42,564	528
0,214	N/A	0,114	3,861	6,147	3,747	6,033	17,509	28,192	647
0,202	0,21	0,124	3,473	4,872	3,349	4,748	16,579	23,505	695
0,191	0,19	0,133	3,417	3,953	3,284	3,820	17,194	20,000	743
0,147	0,10	0,113	4,246	5,994	4,133	5,881	28,116	40,007	839
0,162	0,09	0,131	5,695	8,011	5,564	7,880	34,346	48,642	863
0,187	0,09	0,167	6,441	8,881	6,274	8,714	33,551	46,599	888
0,227	0,09	0,228	8,151	10,69	7,923	10,462	34,903	46,088	959
0,176	0,08	0,187	5,934	7,572	5,747	7,385	32,653	41,960	1031
0,185	Low.	0,214	5,805	7,240	5,591	7,026	30,222	37,978	1055
0,061	Low.	0,092	2,482	2,553	2,390	2,461	39,180	40,344	1199
0,075	Low.	0,093	2,708	2,751	2,615	2,658	34,867	35,440	1247
0,051	Low.	0,092	2,801	2,814	2,709	2,722	53,118	53,373	1296
0,045	Low.	0,061	2,528	2,515	2,467	2,454	54,822	54,533	1344
0,068	Low.	0,112	3,967	3,884	3,855	3,772	56,691	55,471	1391

Figur B. 7: Utvikling av biomasse for kultur D,1 på semilogaritmisk skala.



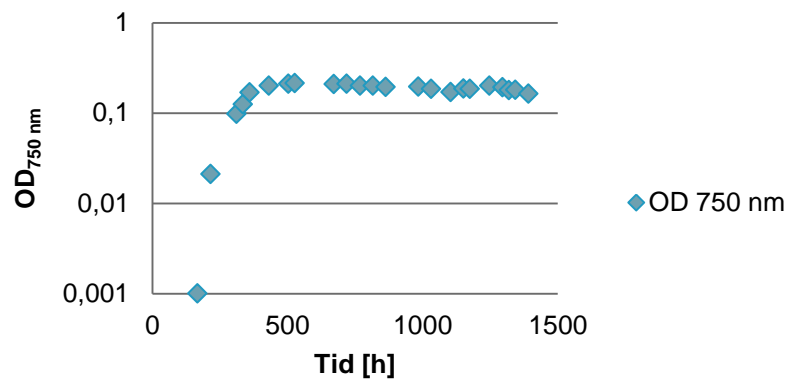
Figur B. 8: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur D,0 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



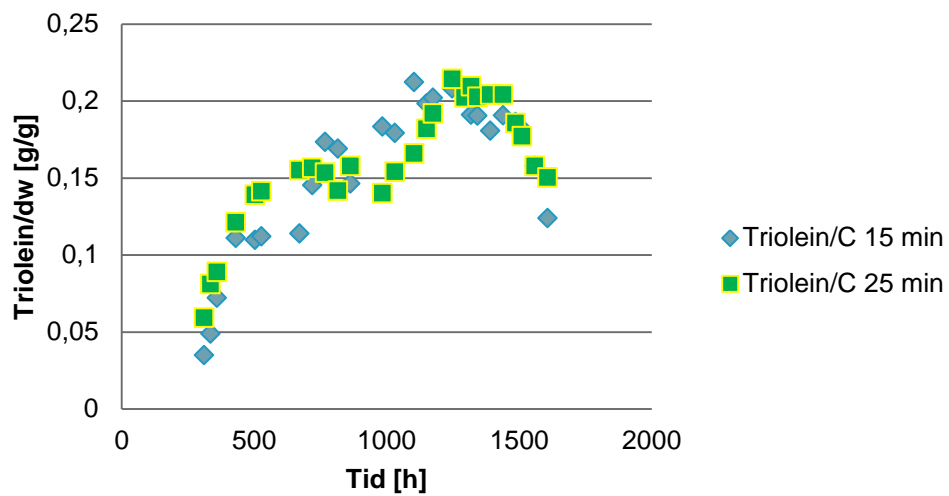
Tabell B. 5: Rådata for kultur D,2

<i>OD₇₅₀</i>	<i>QY</i>	<i>NR_{ref}</i>	<i>NR_{15 min}</i>	<i>NR_{25 min}</i>	<i>Net. NR_{15 min}</i>	<i>Net. NR_{25 min}</i>	<i>NR_{15 min}/OD</i>	<i>NR_{25 min}/OD</i>	<i>Tid [timer]</i>
0,001	0,69								167
0,021	0,65								215
0,098	0,64	0,067	1,142	1,888	1,075	1,821	10,969	18,582	311
0,125	0,59	0,046	1,962	3,225	1,916	3,179	15,328	25,432	335
0,169	0,55	0,076	3,901	4,799	3,825	4,723	22,633	27,947	360
0,200	0,49	0,100	7,070	7,715	6,97	7,615	34,850	38,075	431
0,211	0,41	0,084	7,354	9,291	7,27	9,207	34,455	43,635	503
0,214	0,43	0,104	7,636	9,600	7,532	9,496	35,196	44,374	527
0,209	0,38	0,111	7,586	10,28	7,475	10,17	35,766	48,656	671
0,210	0,36	0,102	9,682	10,42	9,580	10,32	45,619	49,133	719
0,200	0,32	0,109	11,00	9,743	10,891	9,634	54,455	48,170	768
0,201	0,33	0,118	10,78	9,069	10,662	8,951	53,045	44,532	816
0,194	0,31	0,118	9,025	9,726	8,907	9,608	45,912	49,526	863
0,195	0,19	0,101	11,32	8,676	11,219	8,575	57,533	43,974	984
0,185	0,18	0,117	10,52	9,059	10,403	8,942	56,232	48,335	1031
0,171	0,18	0,118	11,51	9,020	11,392	8,902	66,620	52,058	1103
0,187	0,20	0,128	11,77	10,80	11,642	10,67	62,257	57,070	1151
0,185	0,18	0,132	11,87	11,28	11,738	11,15	63,449	60,259	1175
0,200	0,12	0,186	13,25	13,64	13,06	13,45	65,320	67,270	1247
0,192	0,05	0,169	12,62	12,36	12,45	12,19	64,849	63,495	1295
0,179	0,01	0,170	10,91	11,95	10,74	11,78	60,000	65,810	1319
0,181	0,16	0,175	10,99	11,69	10,82	11,52	59,751	63,619	1343
0,164	0,17	0,161	9,464	10,67	9,30	10,51	56,726	64,079	1391
0,157	0,12	0,180	9,578	10,24	9,40	10,060	59,860	64,076	1439
0,179	0,12	0,206	10,67	10,64	10,46	10,43	58,458	58,291	1486
0,181	0,11	0,219	10,56	10,28	10,34	10,06	57,133	55,586	1511
0,174	Low	0,205	8,819	8,820	8,614	8,615	49,506	49,511	1559
0,198	Low	0,259	7,961	9,596	7,702	9,337	38,899	47,157	1607

Figur B. 9: Utvikling av biomasse for kultur D,2 på semilogaritmisk skala.



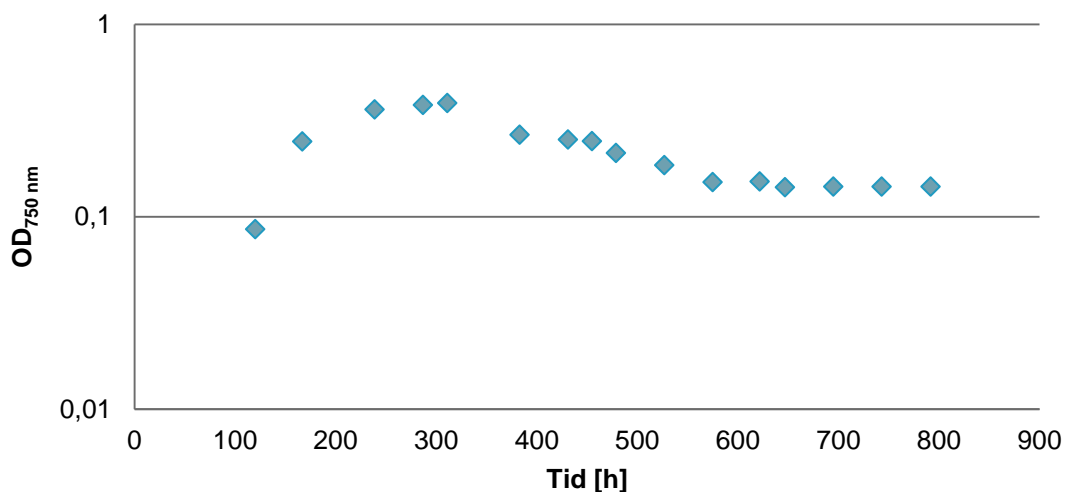
Figur B. 10: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur D,2 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



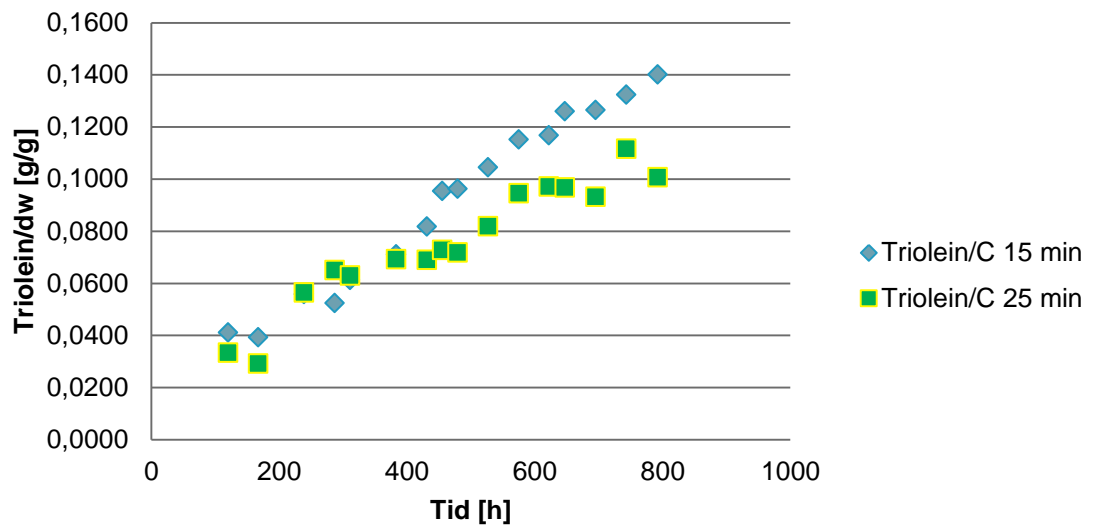
Tabell B. 6: Rådata for kultur D,3

OD_{750}	QY	NR_{ref}	$NR_{15\ min}$	$NR_{25\ min}$	Net. $NR_{15\ min}$	Net. $NR_{25\ min}$	$NR_{15\ min}/OD$	$NR_{25\ min}/OD$	Tid [timer]
0,086	0,62	0,059	1,168	0,960	1,109	0,901	12,895	10,477	120
0,245	0,66	0,083	3,101	2,331	3,018	2,248	12,318	9,176	167
0,360	0,48	0,110	6,428	6,496	6,318	6,386	17,550	17,739	239
0,380	0,38	0,106	6,357	7,864	6,251	7,758	16,450	20,416	287
0,388	0,37	0,118	7,575	7,792	7,457	7,674	19,219	19,778	311
0,266	0,38	0,124	6,061	5,911	5,937	5,787	22,320	21,756	383
0,251	0,38	0,114	6,560	5,554	6,446	5,440	25,681	21,673	431
0,246	0,38	0,103	7,470	5,726	7,367	5,623	29,947	22,858	455
0,214	0,35	0,107	6,576	4,935	6,469	4,828	30,229	22,561	479
0,185	0,34	0,112	6,179	4,872	6,067	4,760	32,795	25,730	527
0,151	0,38	0,090	5,553	4,572	5,463	4,482	36,179	29,682	575
0,152	0,37	0,102	5,676	4,738	5,574	4,636	36,671	30,500	622
0,142	0,36	0,087	5,702	4,403	5,615	4,316	39,542	30,394	647
0,143	0,37	0,101	5,782	4,283	5,681	4,182	39,727	29,245	695
0,143	0,44	0,114	6,058	5,124	5,944	5,010	41,566	35,035	743
0,143	0,37	0,106	6,395	4,628	6,289	4,522	43,979	31,622	792

Figur B. 11: Utvikling av biomasse for kultur D,3 på semilogaritmisk skala.



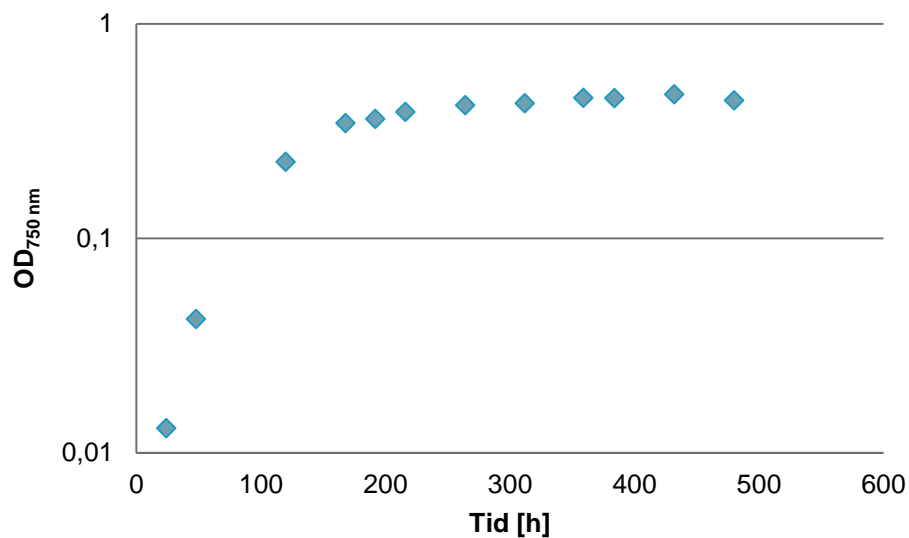
Figur B. 12: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for kultur D,2 målt etter 15 og 25 min innfargingstid.



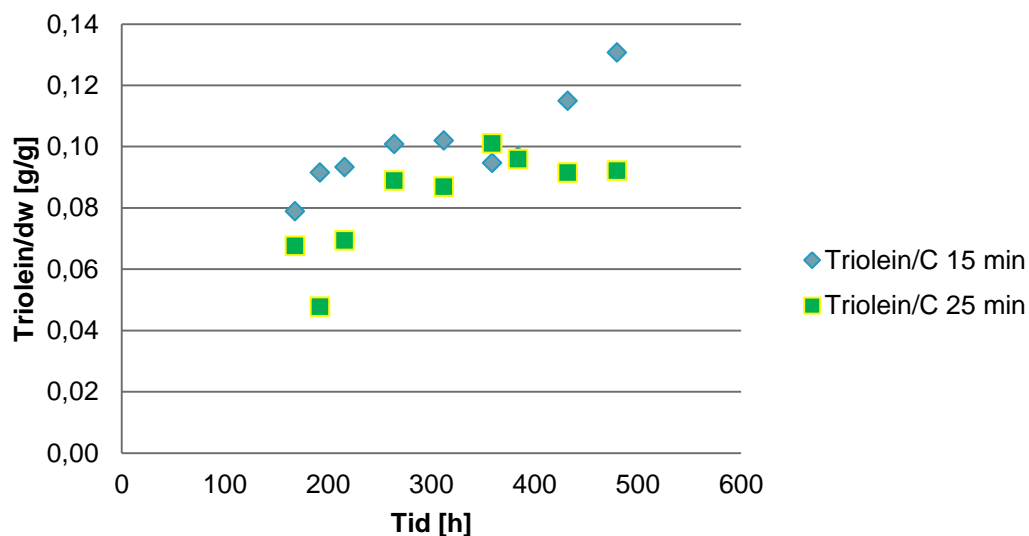
Tabell B. 7: Rådata for oppskalert kultur M

OD_{750}	QY	NR_{ref}	$NR_{15\ min}$	$NR_{25\ min}$	Net. $NR_{15\ min}$	Net. $NR_{25\ min}$	$NR_{15\ min}/OD$	$NR_{25\ min}/OD$	Tid [timer]
0,013	0,79								24
0,042	0,72								48
0,227	0,64								120
0,344	0,52	0,086	8,609	7,385	8,523	7,299	24,776	21,218	168
0,359	0,45	0,080	10,40	5,464	10,320	5,384	28,747	14,997	192
0,388	0,41	0,107	11,47	8,559	11,363	8,452	29,286	21,784	216
0,417	0,39	0,112	13,31	11,76	13,198	11,648	31,650	27,933	264
0,425	0,40	0,118	13,73	11,72	13,612	11,602	32,028	27,299	312
0,450	0,44	0,120	13,49	14,39	13,370	14,270	29,711	31,711	359
0,449	0,45	0,124	13,76	13,64	13,636	13,516	30,370	30,102	384
0,468	0,48	0,145	17,03	13,60	16,885	13,455	36,079	28,750	432
0,439	0,49	0,27	18,29	12,98	18,020	12,710	41,048	28,952	480

Figur B. 13: Utvikling av biomasse for oppskalert kultur M på semilogaritmisk skala.



Figur B. 14: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for oppskalert kultur M målt etter 15 og 25 min innfargingstid.

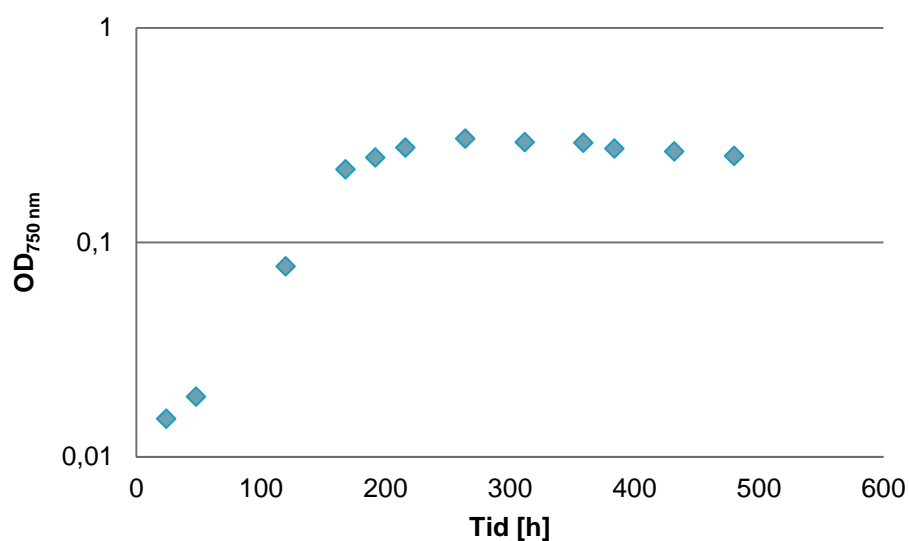


Rådata for kultur D

Tabell B. 8: Rådata for oppskalert kultur D

OD_{750}	QY	NR_{ref}	$NR_{15 min}$	$NR_{25 min}$	Net. $NR_{15 min}$	Net. $NR_{25 min}$	$NR_{15 min}/OD$	$NR_{25 min}/OD$	Tid [timer]
0,015	0,62								24
0,019	0,71								48
0,077	0,67								120
0,218	0,62	0,076	7,239	6,884	7,163	6,808	32,858	31,229	168
0,248	0,57	0,091	10,16	9,388	10,069	9,297	40,601	37,488	192
0,276	0,54	0,098	12,72	12,24	12,622	12,142	45,732	43,993	216
0,304	0,55	0,103	14,82	12,77	14,717	12,667	48,411	41,668	264
0,292	0,53	0,092	14,72	14,19	14,628	14,098	50,096	48,281	312
0,290	0,50	0,117	15,50	12,02	15,383	11,903	53,045	41,045	359
0,273	0,46	0,096	15,94	11,24	15,844	11,144	58,037	40,821	384
0,265	0,44	0,098	14,67	9,098	14,572	9,000	54,989	33,962	432
0,252	0,41	0,117	14,66	9,115	14,543	8,998	57,710	35,706	480

Figur B. 15: Utvikling av biomasse for oppskalert kultur D på semilogaritmisk skala.



Figur B. 16: Utvikling av spesifikt lipidinnhold for oppskalert kultur D målt etter 15 og 25 min innfargingstid.

