

Ole Jakob Måsøval
Sander Kleven

Praktiske forsøk med *Tetraselmis* og *Isochrysis*, og mikroalgers situasjon som høykost-produkt i Norge.

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Birgitte Paulsen Torset og Stig Atle Tuene
Mai 2021

Ole Jakob Måsøval
Sander Kleven

Praktiske forsøk med *Tetraselmis* og *Isochrysis*, og mikroalgers situasjon som høykost-produkt i Norge.

Bacheloroppgave i Biomarin innovasjon
Veileder: Birgitte Paulsen Torset og Stig Atle Tuene
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund

Forord

Arbeidet i denne bacheloroppgaven ble utført fra januar til mai i vårsemesteret 2021. Oppgaven tar for seg ulike forsøk på laboratoriet ved NTNU i Ålesund rundt dyrking av mikroalger, samt situasjonen og potensialet for mikroalger som høykost-produkt i Norge. Hensikten med forsøkene er med all intensjon å sette et sterkere lys på mikroalgers potensial i Norge.

Begge deltakere har stor interesse om mikroalgens muligheter kommersielt. I løpet av semesteret har begge deltakere utviklet god kunnskap og erfaring om *Tetraselmis* og *Isochrysis* og vil ta med dette til videre utdanning.

Grunnet covid-19-restriksjoner var delen av arbeidet med fettsyrebestemmelser av algene etter vekst med ulike verdier av nitrogen og fosfor vanskelig å gjennomføre.

Takk til laboratoriet ved NTNU i Ålesund og Atlanterhavsparken for tilgang på sjøvann.

Spesiell takk til veiledere Birgitte P. Torset og Stig A. Tuene, samt PhD-student Kristine Kvangarsnes for god akademisk og praktisk veiledning.

Sammendrag

Mikroalger kan bidra til bærekraftige og etiske løsninger på en rekke globale utfordringer. Algene kan brukes som mat til mennesker, kosttilskudd, dyrefôr, biodrivstoff, avløpsrensing, samt naturlig produsent av fargestoff, hydrogen og ingrediens i kosmetikk. I løpet av denne oppgaven har deltakerne samlet erfaring og kompetanse gjennom dyrking av artene *Isochrysis* og *Tetraselmis* på laboratoriet ved NTNU i Ålesund, samt vurdert situasjonen med mikroalger som høykost-produkt i Norge.

Første del av det praktiske arbeidet besto av oppskaleringer, hvor det ble dyrket og oppskalert kulturer av begge artene fra 40 ml til 8 l tett kultur i løpet av fire uker. I neste forsøk ble det ekstrahert lipider og fettsyresammensetningen ble bestemt ved bruk av gasskromatografi.

Resultatene viste lovende prosenter av flere umettede fettsyrer, som er attraktive til humant konsum. Til slutt undergikk begge arter næringsstress, dyrket med 50% og 150% innhold av nitrogen og fosfor for å utforske hvordan det påvirket vekst og fettsyresammensetning.

Resultatene viste likt med tidligere forskning sprikende vekst i kulturene, hvor veksten i kolbene med 150% fosfor og nitrogen var stor.

Det forskes en del på mikroalger i Norge til ulike formål. Potensialet til produksjon av høykost-produkt eksisterer, men det er per nå dyrt og selges hovedsakelig i sunnkost-butikker. Et fåtall aktører dyrker mikroalger kommersielt. Både innendørs og utendørs dyrking kan anvendes avhengig av algenes formål, men til humant konsum egner fotobioreaktorer seg best. Med et økende fokus på sunnhet og bærekraft kan riktig markedsføring, sammen med teknologisk innovasjon, finansielle investeringer og senkede produksjonskostnader, gjøre mikroalger som høykost-produkt til en mer attraktiv, kommersiell vare i Norge og internasjonalt.

Abstract

Microalgae can contribute to sustainable and ethical solutions to a number of global challenges. The algae can be used as food for humans, dietary supplements, animal feed, biofuels, sewage treatment, as well as natural producers of dyes, hydrogen and ingredients in cosmetics. During this thesis, the participants have gathered experience and expertise through the cultivation of the species *Isochrysis* and *Tetraselmis* in the laboratory at NTNU in Ålesund, as well as assessed the situation with microalgae as health-supplements in Norway. The first part of the practical work consisted of upscaling, where cultures of both species were grown and scaled up from 40 ml to 8 l of dense culture over four weeks. In the next experiment, lipids were extracted and the fatty acid composition was determined using gas chromatography. The results showed promising percentages of several unsaturated fatty acids, which are attractive for human consumption. Finally, both species underwent nutrient stress, grown with 50% and 150% nitrogen and phosphorus content to explore how it affected growth and fatty acid composition. The results showed similar growth in the cultures, as in previous research, where the growth in the flasks with 150% phosphorus and nitrogen was large. There is a lot of research on microalgae in Norway for various purposes. The potential for the production of health-supplement products exists, but it is currently expensive and is sold mainly in healthy food stores. A few players grow microalgae commercially. Both indoor and outdoor cultivation can be used depending on the purpose of the algae, but photobioreactors are best suited for human consumption. With an increasing focus on health and sustainability, proper marketing, together with technological innovation, financial investments and reduced production costs, this can make microalgae as health supplements more attractive, commercial products in Norway and internationally.

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|-----------|
| 1 Innledning | 5 |
| 1.1 Isochrysis Galbana | 7 |
| 1.2 Tetraselmis Subcordiformis | 7 |
| 1.3 Algedyrking | 7 |
| 1.3.1 Økonomi | 8 |
| 1.4 Dyrkingsbetingelser | 8 |
| 1.5 Endring av miljøfaktorer | 10 |
| 1.6 Situasjonen i Norge | 11 |
| 1.7 Problemstilling | 12 |
| 2 Materialer & metoder | 13 |
| 2.1 Algedyrking | 13 |
| 2.1.1 Filtrering av sjøvann | 13 |
| 2.1.2 Autoklav | 13 |
| 2.1.3 Tillaging av F/2 vekstmedium | 14 |
| 2.1.4 Flambering av utstyr, varmesterilisering | 14 |
| 2.2 Fettsyrebestemmelse | 14 |
| 2.3 Algedyrking under næringsstress | 14 |
| 2.3.1 Måling av absorbans | 15 |
| 2.3.2 Celletelling | 15 |
| 3 Resultater | 16 |
| 3.1 Oppskalering | 16 |
| 3.2 Fettsyrebestemmelse av I.galbana & T.subcordiformis | 18 |
| 3.3 Vekst og fettsyresammensetning under næringsstress | 19 |
| 4 Diskusjon | 22 |
| 4.1 Oppskalering | 22 |
| 4.2 Fettsyrebestemmelse av I.galbana og T.subcordiformis | 24 |
| 4.3 Vekst og fettsyresammensetning ved næringsstress | 25 |
| 4.4 Situasjonen i Norge | 26 |
| 6 Konklusjon | 29 |
| 7 Referanser | 29 |
| 8 Vedlegg | 38 |

1 Innledning

Menneskeheten går inn i 2020-årene med en rekke omfattende utfordringer. Globale problemer som klimaendringer, naturødeleggelse og sult vil de neste årene prege mye av verdens innovasjon. Befolkningen har de siste 70 årene steget fra 2,5 til 7,5 milliarder og vil trolig stige til nesten 10 milliarder innen 2050 (Chamberlain 2020). Hånd i hånd med denne eksplosive befolkningsveksten kommer økt forbruk av mat, energi og materialer. FN forutser at vi må produsere 50% mer mat innen 2050 (Animalia 2019), og med voksende økonomisk tilstand hos flere millioner vil forbruket øke parallelt. I dag er rundt halvparten av jordas dyrkbare områder brukt til matproduksjon (Ritchie and Roser 2019, s. 2). Selv om ca. 71% av klodens overflate består av vann, er mengden mat vi produserer på land overlegen i forhold til mat produsert fra havet. Kun 17% av proteiner mennesker konsumerer kommer fra havet (Costello *et al.* 2020). Likevel har overfiske- og utnyttelse av havets ville arter ført til kollaps eller stor nedgang blant flere arter i ulike økosystemer. I senere år har det vært stor oppgang i akvakultur og nå produseres det større biomasse i akvakultur enn det fanges og fiskes villarter (Richie 2019).

De siste årene har vi sett stor progresjon i bærekraftig innovasjon for å takle de globale utfordringene og det er en bred enighet om at havet inneholder flere av løsningene. Blant disse er potensialet til mikroalger anerkjent. Mikroalger er encellede organismer og blant de eldste organismene på jorda. Det er estimert mellom 200 000 – 800 000 arter (Krishna Koyande *et al.* 2019). Organismene forekommer i alle mulige akvatiske miljøer; i saltvann, elver, innsjøer, skogsvann og kloakk (Hyuk Shin, Deog Kim, and Imran Khan 2018). Følgende har mikroalger etter millioner av år utviklet stor diversitet og lever innenfor brede verdier av temperatur, pH, salinitet, oksygen og lystilgang (Hyuk Shin, Deog Kim, and Imran Khan 2018). Bruksområdene er flerfoldige grunnet organismenes interessante nærings sammensetninger, raske vekst og muligheter for manipulasjon. Cellene inneholder lovende profiler av karbohydrater, proteiner, lipider, karotenoider, vitaminer og andre bioaktive komponenter. Mikroalger ser sin fremgang for humant konsum, som fôringrediens, biobrensel-, plast- og aktiv komponent i for eksempel kosmetikk. Organismene har også

etablert seg som en lovende komponent i avløpsrensing (Hyuk Shin, Deog Kim, and Imran Khan 2018, 1-2).

Flere mener mikroalger kan være en nødvendig løsning for å møte en økende mat- og føretterspørsel med essensiell og sunn næring, da flere har et høyt innhold av omega-3-fettsyrer, essensielle aminosyrer og attraktive vitaminer (Torres-Tiji, Fields, and Mayfield 2020)(Krishna Koyande *et al.* 2019). Mikroalger er primærprodusenter og følgende det laveste trofiske nivået i næringskjeden (UIO 2011). Til sammenligning er både laks og torsk på det tredje og fjerde nivået i næringskjeden. For hvert trinn i næringskjeden tapes 90% av energien (UIO 2011). En verdifull fordel med mikroalger er stor vekst på kort tid og deres evne til å oppnå eksponentiell vekst, da algene kan vokse 8-10 ganger raskere enn tradisjonell avling (Metting Jr 1996, 485). Ytterligere gjør den hyppige veksten og fettsyreprofilene algene attraktive som biodiesel (Hyuk Shin, Deog Kim, and Imran Khan 2018, 2-3).

Mikroalger til humant konsum er i dag i stor grad solgt som «supermat» hos kosttilskudd-detaljister i form av pulver, tabletter og væske. De finnes også som ingrediens i pasta, nudler, godteri, ulike snacks, vin, drikker og tyggegummi (Krishna Koyande *et al.* 2019). Flere forskere og kommersielle aktører ekstraherer flerumettede fettsyrer, som DHA og EPA, samt karotenoider, som betakaroten og astaxanthin. Karotenoidene er i stor kommersiell vekst, da de brukes som naturlig fargestoff i matvarer, kosmetikk og medisin (Guedes, Amaro, and Malcata 2020, 626). På verdensbasis er land som Australia, USA, Mexico, Japan, Kina, Taiwan og Korea, i tillegg til europeiske land som Tyskland, Spania og Frankrike ledende i mikroalgeproduksjon (Biofuel Digest 2012). Arter som *Spirulina plantesis*, *Chlorella sp.* og *Dunaliella terticola* er i stor grad kultivert til humant konsum grunnet deres høye proteininnhold (Krishna Koyande *et al.* 2019). I 2019 var det produsert rundt 12000 tonn *Spirulina* og 5000 tonn *Chlorella*, med andre ord de mest populære artene (Krishna Koyande *et al.* 2019). Det er en rekke ulike arter som ser sin framgang på markedet. I denne oppgaven sees det nærmere på den relativt godt kjente arten *Isochrysis galbana*, samt den mindre kjente *Tetraselmis subcordiformis*. NTNU og veiledere har erfaring og tilgang på de respektive artene og de ble derfor valgt for denne oppgaven.

1.1 *Isochrysis Galbana*

I.galbana er en brungul alge i isochrysis-slekten. Den er en saltvannsart og har en meget rund form. De respektive artene er flagellater. Med andre ord beveger de seg ved hjelp av flageller, som er lange tynne strukturer som fungerer som “propeller”. *I.galbana* er en svepeflagellat med to flageller med en roterende bevegelse. Cellen er kun 5-6 μm lang, men har flageller som kan være opp til 7 μm (Thronsdén and Tomas 1997, 7). *Isochrysis*-slekten består av betraktelige mengder proteiner. Tørrstoffet til *I.galbana* består av ca. 41,53-46,81% proteiner (nitrogen*6,25), 22,54% lipider og 22,54% karbohydrater (Hoff and Snell 1987, 30).

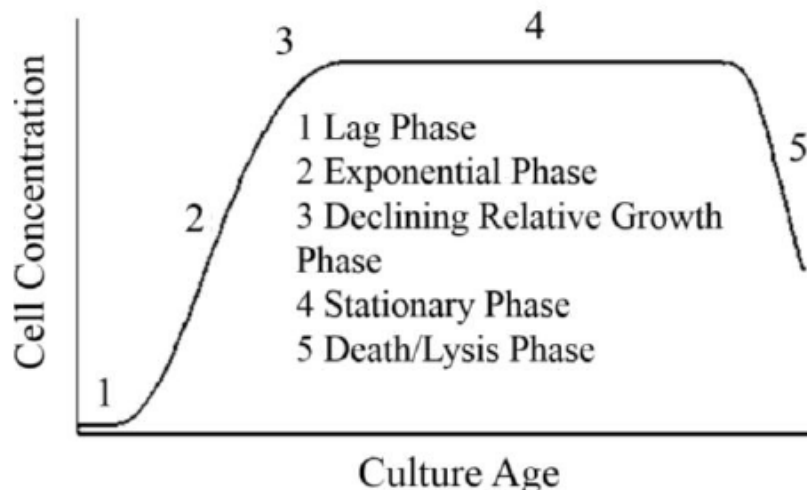
1.2 *Tetraselmis Subcordiformis*

T.subcordiformis er en grønnalge i tetraselmis-slekten. Artene i denne slekten bærer preg av en intens grønnfarge i kloroplasten. *T.subcordiformis* har fire flageller for rask bevegelse og har en størrelse på 10-20 μm (Yao *et al.* 2012, 439). Denne arten finnes naturlig både i salt- og ferskvann. Tørrvekten av cellen inneholder ca. 46,38% protein (nitrogen*6,25), 5,09% fett og 27,43% karbohydrater (Hoff and Snell 1987, 30).

1.3 Algedyrking

Mikroalger dyrkes hovedsakelig i åpne konsept (dammer) eller i lukkede systemer (fotobioreaktorer) (Tan *et al.* 2020, 118-119). I fotobioreaktorer kontrolleres næringsinnhold og abiotiske faktorer som pH, temperatur, salinitet, lyssyklus- og intensitet, vannkvalitet og CO₂-tilførsel (Raja *et al.* 2014, 3). En er ute etter verdier for optimal vekst, og kontaminasjon er begrenset, sammenlignet med åpne systemer. Oksygenet algene produserer gjennom fotosyntesen må fjernes. Det er ulike metoder for å dyrke alger i fotobioreaktorer, som for eksempel flatpanel-, tubulær- og fermenteringsreaktorer (Norsker *et al.* 2011, 24) (Hyuk Shin, Deog Kim, and Imran Khan 2018, 4). I fermenteringsreaktorer blir det tilsatt organiske stoffer, som sukker, som enda en energikilde. Denne typen reaktor kan anvendes ved dyrking av miksotrofe eller heterotrofe arter, med andre ord arter som kan eller må hente energi fra organiske komponenter (Liu, Sun, and Chen 2014, 112). Åpne løsninger er ofte av typen “raceway”. I disse dammene er algene i bevegelse ved hjelp av hjul og de er som regel ikke dypere enn 70 cm (Raja *et al.* 2014, 3). Denne løsningen er ofte en del billigere og enklere å bruke enn fotobioreaktorer, men er utsatt for kontaminasjon og tilbyr ikke muligheten for å kontrollere lys, temperatur eller andre faktorer. Valg av system avhenger av arten og produktet som skal fremstilles. I denne oppgaven jobbes det med småskala dyrking i en form

for fotobioreaktor som en batch-kultur. I en klassisk batch kultur tas det ikke ut biomasse underveis, og næring tilsettes kun når kulturen oppskaleres til større volumer. Algeveksten består som oftest, som vist i Figur 1, av 5 faser - henholdsvis lag, eksponentiell, avtagende relativ vekst, stasjonær og død (Farag and Price 2013, 50).



Figur 1: Fem faser av veksten i en algekultur: lag, eksponentiell, avtagende relativ vekst, stasjonær og død. (Farag and Price 2013, s 50).

1.3.1 Økonomi

For produksjon av mikroalger finnes det foreløpig estimater for kostnader og inntekter, men ingen konkrete tall. For produksjon med metodene åpen dam, flatpanel- og tubulær fotobioreaktor er det fra produksjon i Nederland estimert kostnader for produksjon av biomasse (tørrestoff) og avvanning til 4,95, 5,96 og 4,15 €/kg, respektivt (Norsker *et al.* 2011, 24). Metodenes kostnader er sammenlignet for å vise faktorer inngående i totale produksjonskostnader i Vedlegg 1. Produktiviteten er som regel høyere i fotobioreaktorer, fra 0,65 til 1,5 kg/m³/dag, enn i åpne systemer a type raceway, fra 20 til 30 g/m³/dag (Delrue *et al.* 2012, 194). På det tyske markedet er det store variasjoner i utsalgspris for biomasse av mikroalger (tørrestoff) - alt fra 38 til 109 €/kg (Schade and Meier 2021, 9).

1.4 Dyrkingsbetingelser

F/2 medium og næring

F/2 medium er en blanding av essensielle næringsstoffer som tilsettes kulturvannet algene dyrkes i. Dette vekstmediet er vanlig for dyrking av saltvannsarter, mens Provasoli ES-medium er vanlig for ferskvannsarter (Hoff and Snell 1987, 33). Begge kan dog brukes for de fleste arter. F/2-mediet består av fem stamløsninger . Nitrogen er som for alle andre

levende organismer viktig, hovedsakelig for å bygge aminosyrer i proteinene. Nitrogen kan komme fra ulike kilder, som ammoniakk, nitritt og andre organiske kilder. Nitrogen fra nitrat i form av natriumnitrat (NaNO_3) er uansett den mest brukte og stabile kilden. Fosfor er et annet viktig næringsstoff for mikroalger, i tillegg til svovel. Det er en rekke spormetaller som er essensielle for god helse og vekst, henholdsvis jern, kobber, sink, mangan og molybden. F/2-mediet inneholder også EDTA (etylendiamintetraacetat), som holder metallene i oppløst form (Hoff and Snell 1987, 33). Det er særlig tre vitaminer som er sentrale for alle mikroalger - vitamin B12, biotin (vitamin H) og tiamin (vitamin B1)(Hoff and Snell 1987, 32-33).

Temperatur

Det meste av kommersiell dyrking er av tropiske arter med optimale vekstforhold mellom 16 og 27 grader. Små variasjoner i temperaturen vil ikke drepe kulturen, men kan gi dårligere vekst. *I.galbana* vokser best mellom 14 og 22 grader, mens *T.subcordiformis* vokser best mellom 20 og 28 grader (Hoff and Snell 1987, 31-32). Mikroalger som naturlig forekommer i nordiske områder er tilpasset kondisjonene her, og kan vokse godt i relativt lave temperaturer.

Lysintensitet

Lysintensitet forteller hvor mange lyspartikler som sendes ut fra en lyskilde (UIO Institutt for biovitenskap 2011). De fleste alger reagerer på rødt og blått lys. Brune alger vokser for eksempel best i blå bølgelengder. I store kulturer vil etterhvert densiteten øke, og det skygges for mange av cellene, som igjen gir dårligere vekst. Beholderens konfigurasjon og sirkulasjonen innad er derfor viktig. *T.subcordiformis* vokser best mellom 5000 og 10000 lux, mens *I.galbana* kan vokse godt mellom 2500-10000 lux (Hoff and Snell 1987, 31). “Lux er måleenhet for illuminans (belysningsstyrke). Den er definert som lysfluksen (lysstrømmen) mot en flate dividert med arealet av flaten” (Hofstad 2018).

Salinitet

Salinitet er viktig og handler om hvor mange gram løste salter per kilogram vann og måles i promille (Barthel and Universitetet i Bergen 2018). *I.galbana* trives i 10-30 ppt salinitet, og *T.subcordiformis* i et bredt spekter fra 6 til 40 ppt (Hoff and Snell 1987, 32).

pH

Alger lever naturlig i varierende pH-verdier, men for høye eller for lave pH-verdier forstyrrer samtlige cellulære prosesser. Dersom lyset og mørket er kontrollert øker gjerne pH under

lysperioden, for så å synke igjen under mørket, som kan gi en balanse. Når CO₂ brukes kan det være lurt å tilsette periodisk med timer for å holde pH mellom 7,5 og 8,5. pH-verdier mellom 8 og 9 er ideelt for de respektive artene i denne oppgaven (Hoff and Snell 1987, 34).

Oksygen og CO₂

Både oksygen- og CO₂-nivå er avgjørende faktorer for algenes vekst og overlevelse. Mikroalger bruker karbondioksid i sin fotosyntese, for så å slippe ut oksygen. Å forbedre sirkulasjon av karbondioksid eller natrium bikarbonat (NaHCO₃) kan forlenge eksponentiell vekst. Begge kan påvirke pH, så det må observeres for optimale tilstander. Det finnes dog en grenseverdi, hvor over 5% CO₂ kan virke hemmende. (Hoff and Snell 1987, 33-34).

Sirkulasjon

Sirkulasjon er for mange arter en viktig faktor for å unngå klumping av algene. Relativt små endringer i sirkulasjonen kan positivt endre produktiviteten hos mikroalgene (Hofstad 2018).

Kontaminering

Generelt i all dyrking kan det oppstå kontaminasjon. Når det gjelder dyrking av mikroalger er det særlig kjemisk og biologisk kontaminasjon som kan være trusler. Kjemisk kontaminasjon kan for eksempel være gjenværende klor fra vasking av en kolbe. I algedyrking er det nødvendig at alle rester av kjemikalier er fjernet før kontakt med kulturen, slik at kjemikalieinnholdet ikke overgår en skadelig mengde. Biologisk kontaminering i lukkede systemer er ofte bakterier. De kommer gjerne fra urent utstyr. Derfor legges det vekt på viktigheten rundt renhold og sterilisering av alt utstyr. Det er også flere andre mikrober, som flimmerdyr og protozoer, som naturlig lever i sjøvann. Av den grunn er det nødvendig å filtrere og sterilisere vannet som benyttes i algekulturen (Hoff and Snell 1987, 34-36).

1.5 Endring av miljøfaktorer

Forskere har funnet ut at en kan fremme ønskede næringsverdier og forstyrre normale vekstrater i mikroalger ved å endre på ulike faktorer i algekulturene. Miljøfaktorer som salinitet, pH, temperatur, lys og næringsinnhold i vekstmediet vil påvirke vekst, fotosyntese og cellenes metabolisme, som igjen påvirker cellenes fysiologi og struktur (Huang *et al.* 2012, 130). Det er derfor mulig å manipulere cellenes kjemiske sammensetning for å for eksempel få høyere proteininnhold til fôr, eller oppnå høyere omega-3 innhold til kosttilskudd

og fôr. De har metabolske forsvarsmekanismer som slår inn når enten temperatur, lys eller næring er av for lave verdier. Mekanismene resulterer i økt lipidinnhold i cellemembranene - ofte av flerumettede fettsyrer som EPA og DHA (Cherigi *et al.* 2019, 442). Særlig sammensetningen og mengden lipider i cellene er man ute etter å manipulere, da lipidene er essensielle for at algene skal egne seg som biodrivstoff. En rekke studier viser til at nitrogen- og fosfor-sulting av kulturer fører til økt og ulike lipidsammensetninger hos mikroalger (Sajjadi *et al.* 2018, 204) (Suen *et al.* 1987, 291) (Chen *et al.* 2017, 1199).

Manipulering av abiotiske og biotiske faktorer skal også ha stor påvirkning på vekstraten til mikroalger. For eksempel skal en økning i nitrogeninnhold gi større vekst hos *T.subcordiformis*, men samtidig et redusert lipidinnhold (Huang *et al.* 2012, 131-132). Hvis en senker nitrogeninnhold, kan det øke lipidinnholdet til tross for dårligere vekst. Lignende resultater er oppnådd under nitrogenstress hos *I.galbana*-kulturer. Økt nitrogeninnhold gir økt vekst. Det er nødvendig å skille mellom ulike typer fettsyrer når en analyserer lipidsammensetninger. Det er gjerne flerumettede fettsyrer en er ute etter innen fôr- og kosttilsetning, men ikke så mye av mettede fettsyrer. I tilfellet med *I.galbana* ga større mengder nitrogen økt lipidproduksjon, men innholdet av mettede fettsyrer økte til tross for dette (Javad Zarrinmehr *et al.* 2019, 153).

Fosfor har også stor innflytelse på algekulturer. Fosfor er avgjørende for cellenes evne til å utføre metabolistiske handlinger og er en fundamental hjørnestein av nukleotid og molekylene i celler kjent som fosfolipider (S.M. 2019, 359-373). Gjeldende for flere arter av mikroalger, vil sulting av fosfor påvirke vekst, fysiologi og struktur av cellene (Tillberg and Rowley 2006, 315-324). I et forsøk med fosformanipulering i *I.galbana* kulturer får en liknende resultater som når en endrer på nitrogeninnholdet. Med andre ord gir reduksjon i fosforinnhold redusert vekst, men øker samtidig lipidinnholdet (Yingying and Changhai 2009, 227).

1.6 Situasjonen i Norge

Hittil har det meste som er blitt gjort med mikroalger i Norge vært på forskningsbasis ved institusjoner som NIBIO, NIVA, UiO, NTNU, UiB og UiT. Det jobbes mot flere ulike formål - hovedsakelig avløpsrensing og akvakultur. Ved Mongstad dyrker konsortiumet CO2BIO, en norsk algepilot (NAM), mikroalger i lukkede fotobioreaktorer med omega-3 kilde i laksefôr

som endelig produkt. Dette utføres ved utnyttelse av CO₂-utslipp fra teknologisenteret ved Mongstad (CO₂BIO AS, n.d.) (Kjetland 2016). Representanter fra UiB har funnet at kiselalgene *P.tricornutum* og *Attheya septentrionalis* er godt tilpasset nordiske kondisjoner, til tross for store sesongvariasjoner vedrørende salinitet, temperatur og fotosyntetisering i løpet av døgnet (Cherigi *et al.* 2019, 442). Fôrprodusenter som Vital Seafood har egen fotobioreaktor hvor mikroalgene produseres (Kyst.no 2019). Norsk institutt for bioenergi (NIBIO) satte i 2017 i gang prosjektet Alge for fremtiden (A2F), som skal «legge grunnlaget for industriell mikroalgeproduksjon i Norge» (NIBIO 2017). Det utvikles kunnskap om mikroalger sitt potensial i landet, men få aktører har startet kommersiell dyrking. Det er noen eksempler, som Fjordalg og MicroA. Fjordalg er et norsk firma som jobber med en mer bærekraftig og naturlig kilde til astaxanthin (FjordAlg AS 2018) – et rødfarget pigment som blant annet brukes i laksefôr for å gi laksekjøttet en tiltalende farge (Nofima *et al.* 2020). MicroA er et norsk firma som jobber med å produsere ulike mikroalger for henholdsvis å selge bioaktiv-, kosmetikk- og fôringsredienser (Andersen 2015). Det er få i Norge som dyrker *I.galbana* og *T.subcordiformis*, men et firma med navn Marin Yngel AS produserer begge artene, pluss et par andre, som direkte føde til rotatorier, før disse igjen gis som startfôr til fiskelarver (Havlandet Marin Yngel AS, n.d.). I Norge selges mikroalger hovedsakelig som supermat i form av pulver og tabletter hos høykost-detaljister. Det selges blant annet pulver av *Clorella vulgaris* hos sunkost.no (Sunkost, n.d.). Populariteten med mikroalger som omega-3-kilde har økt, og selges hos en rekke aktører som Vitus Apotek, glimja.no og bodylab.no (vitusapotek, n.d.) (Glimja, n.d.) (bodylab.no, n.d.).

1.7 Problemstilling

Gjennom praktiske forsøk skal deltakere opparbeide nyttig erfaring og sammenligne resultater med tidligere forskning innenfor generell algedyrking og fettsyresammensetningen ved næringsstress for *T.subcordiformis* og *I.galbana*. Norges situasjon med tanke på produksjon av mikroalger som høykost-produkt blir også utredet.

2 Materialer & metoder

Store deler av prosjektet var prosesser i og rundt algedyrking. Det praktiske arbeidet besto av tre deler; algedyrking med oppskalering, fettsyrebestemmelse og algedyrking med næringsstress.

2.1 Algedyrking

Algekulturene i denne oppgaven er dyrket i en batch-kultur. Alle aktiviteter gjort under algedyrkingen og oppskaleringene er visualisert i en kronologisk tidslinje (Vedlegg 2). I alle prosessene rundt algedyrking var det kritisk å ha gode rutiner for renhold og sterilisering. Sentrale prosesser her var autoklaving, filtrering av sjøvann og flambering av utstyr. Det ble brukt to varme white lysrører for *I.galbana* (Vedlegg 3) og et varmt hvitt og et kaldt hvitt for *T.subcordiformis* (Vedlegg 4). Disse ble brukt, fordi de var tilgjengelige. Lysrør ble tilpasset til slik avstand unna kulturene at lysintensiteten (lux) ble målt til omtrent 4000-5500 med lux-måler. Kulturer av *T.subcordiformis* ble etterhvert plassert på et rørebrett. I oppskaleringdelen var det avgjørende å dokumentere vekst ved å ta bilder, men det var ikke nødvendig å foreta tellinger og absorbanmålinger hele tiden. Mørkheten i fargen til kulturene var en god indikator på tettheten og veksten. En annen sentral del av algedyrkingen er tillaging av vekstmediet. Først presenteres ulike prosesser som ble gjennomført flere ganger i løpet av dyrkingen.

2.1.1 Filtrering av sjøvann

Sjøvann ble hentet ved behov fra Atlanterhavsparken, som hadde tilgang på sjøvann fra dype havnivå. I og med at vannet var fra dypere nivå var det rent, men det ble fortsatt utført filtrering og autoklaving på laboratorie før bruk hver gang for å eliminere mulige bakterier, parasitter og liknende. Inne i avtrekksskap ble det utført filtrering ved hjelp av en sugokolbe, klype, filterpapir, begerglass-trakt og vannstrålepumpe (Vedlegg 5). Det filtrerte sjøvannet ble så autoklavert i kolber som kulturene ble oppbevart i.

2.1.2 Autoklav

For å starte en kultur med alger var det viktig å ha sterile omgivelser for kulturen og sterilt utstyr for å hindre kontaminering, på alle slags måter. For å effektivt sterilisere alt utstyr som direkte ville komme i kontakt med kulturene, ble det tatt i bruk en autoklav. Autoklav varmet opp innholdet som ble puttet i til 121 grader og brukte damp sammen med høyt trykk.

2.1.3 Tillaging av F/2 vekstmedium

F/2 vekstmediet består av flere stamløsninger. Stamløsningene ble laget hver for seg og lagret på kjølerom. Når de skulle tilsettes algekulturene, ble 1 ml tilsatt av hver stamløsning pr liter filtrert sjøvann. F/2 mediet ble laget ut i fra oppskriften til Guillard og Ryther (University of Waterloo, n.d.) (Vedlegg 6 av stamløsningene).

2.1.4 Flambering av utstyr, varmesterilisering

Å sterilisere utstyr som brukes under algedyrkingen er avgjørende for algenes helse. Denne steriliseringen ble i stor grad gjort ved å kjapt “brenne” utstyret over brennende propan-/butangass fra en bunsenbrenner. Dette er en effektiv metode for å utrydde mesteparten av uønskede mikrober, slik at de ikke finner veien inn i kulturene. Under tillaging av F/2 var det avgjørende å kjapt flambere tuppene på flaskene av hver stamløsning og filtrert sjøvann. Under prosesser hvor den beskyttende aluminiumsfolien ble tatt av, med andre ord når små prøver av kulturene ble hentet ut eller ved tilsetning av mer vekstmedium, var det også avgjørende å varmebehandle foliet.

2.2 Fettsyrebestemmelse

Den totale prosessen for å gjennomføre bestemmelse av fettsyrer i algekulturene var omfattende. En bestemt mengde algekultur ble tørket ved bruk av frysetørker (3 døgn). Deretter ble lipidene ekstrahert ved metode etter Bligh and Dyer med noen modifikasjoner (Branco-Vieira *et al.* 2017, 5). Modifikasjonene gjaldt mengden isooktan og prøve som ble tilsatt i GCvial (beholder prøven oppbevares i under fettsyrebestemmelse i gaskromatografen). I dette forsøket ble det tilsatt 1,5 ml isooktan og 10 µl prøve i GCvial. Kloroformfasen som inneholdt lipider ble tørket ved å blåse over nitrogen i en varmeblokk (30 °C). Det ble ikke tilsatt 5ml mettet natriumklorid (NaCl) og satt i fryser (-20°C) før GC-analysen, slik det gjøres etter metoden til Bligh and Dyer. Fettsyresammensetningen i lipidfasen/oljen ble bestemt ved bruk av gaskromatografi (GC). Hendelsesforløpet er visualisert i et flytskjema (Vedlegg 7).

2.3 Algedyrking under næringsstress

Dette forsøket ble utført med like metoder som i første forsøk, unntatt tillaging av F/2 vekstmediet. Her ble original oppskrift av mediet modifisert ved å endre på nitrogen- og fosforinnholdet. Det ble klargjort 8 kolber med 5 dl filtrert og sterilisert sjøvann med normale

mengder av stamløsning 3, 4 og 5 (0,5ml per stamløsning). Forsøket bestod av 4 kolber av hver art. Første kolbe inneholdt 50% av stamløsning 1 (0,25 ml), andre kolbe 150% av stamløsning 1 (0,75 ml), tredje kolbe 50% av stamløsning 2 (0,25 ml) og fjerde 150% stamløsning 2 (0,75 ml). I kolbene med redusert eller økt innhold av nitrogen, var innholdet av fosfor normalt. Således hadde kolbene med redusert eller økt innhold av fosfor et normalt innhold av nitrogen. 1 dl av morskulturene ble tilsatt i hver av de næringsmodifiserte kolbene. I motsetning til første forsøk ble det under dyrkingen med næringsstress foretatt tellinger og absorbanmålinger hver hverdag.

2.3.1 Måling av absorban

Absorban er en måleenhet for lysets absorpsjon i væsker og faste stoff (Skarstad Egeland 2018). Ved hjelp av spektrofotometer (Vedlegg 14) ble absorpsjonen for løsningen i kulturene målt i kyvetter (Vedlegg 15), hvor lys ble sendt gjennom fra siden og målte tettheten. Absorbansen ble målt jevnlig hver dag under dyrkingen med næringsstress, og var et viktig verktøy for å underbygge kulturenes reelle vekst. Det ble pipetert ut 1 ml kultur fra hver kolbe over i kyvetter, som ble plassert i spektrofotometeret. Før kulturene ble undersøkt, ble det pipetert 1 ml F/2-vekstmedium i to kyvetter som ble satt i maskinen for å nullstille absorbanen før prøvene med kultur ble undersøkt.

2.3.2 Celletelling

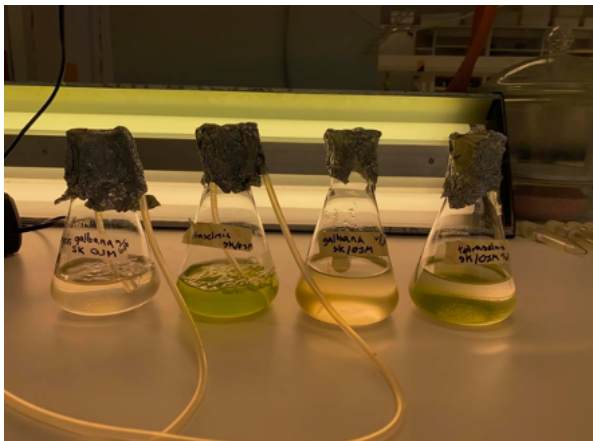
Alle tellinger ble utført ved hjelp av tellekammer i mikroskop. For å telle *T.subcordiformis* ble det pipetert ut 1 ml fra kulturene med automatpipette over i 1,5 ml reaksjonstuber av plastikk (Vedlegg 16). Før telling av *I.galbana* var det ofte nødvendig å fortynne kulturen, da cellene er små og mange i antall. 100 ul kultur ble fortynnet med 900 ul destillert vann, altså forholdstallet 1:9. I reaksjonstuber ble cellene tatt liv av ved hjelp av 1-2 små dråper av Lugols løsning (United States Food & Drug Administration 2020), for å gjøre tellingen lettere. Reaksjonstubene ble satt 5-10 sekunder i "shaker, rister" (Vedlegg 17), for å blandet innholdet. Fra reaksjonstuber ble 15 ul pipetert ut i tellekammer. Tellekamrene som ble brukt var engangs-hemocytometere, av typen Bürker DHC-B02. Antallet ble i A-celler i 16 (4*4) av rutene i kammeret med to dobbeltsider. Mikroskopet ble satt til de innstillingene som gjorde det mulig å observere selv de minste cellene, og brukte en håndholdt teller for å kontrollere at rett mengde ble telt. Begge deltakere deltok i de tellingene, for å gi et mer presist estimat på tettheten. Resultatene ble notert fortløpende i notatbok eller på mobil.

Cellekonsentrasjonen ble utregnet med hjelp av formelen $C = \frac{N}{A*V*F} * 1000$. Her står “C” for cellekonsentrasjonen (celler/ml), N for antall talte celler, V for volumet i tellekammeret og F for fortynningsfaktor med fargevæske. A står for antall A-celler i tellekammeret benyttet som utgangspunkt for N. I denne oppgaven ble det alltid brukt en A-celle per tellekammer og volumet var $0,1 \text{ mm}^3$. Tellekammeret består av 9 A-celler er 1 mm lang og 0,1 mm dyp, og et tellekammer rommer 10 uL.

3 Resultater

3.1 Oppskalering

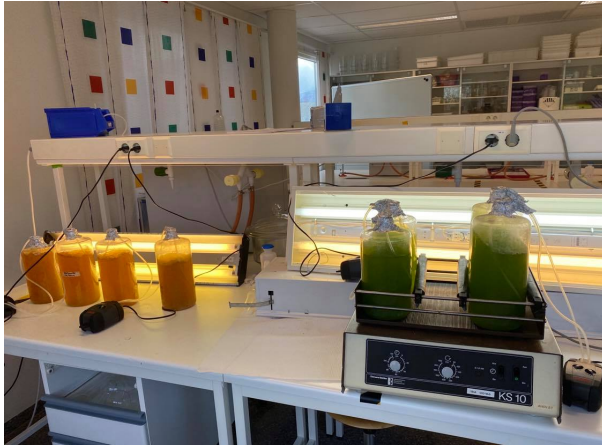
Veksten hos begge arter var god over flere uker, fra 11 februar til 12 mars. Vedleggene 18-25 visualiserer betydelige fargeforandringer i kolbene over tid, med datomerking for å understreke veksten. Oppskaleringer er et tegn på tette kulturer og på fire uker ble maksimal mengde for dette forsøket nådd. 11. februar var det 4 kolber totalt med 150 ml kultur i hver.



Figur 1: Kolber med omtrent 125 ml algekultur, 15. februar. Bilde tatt kort etter overførelse av ren algekultur fra kulturtuber. Totalt 20 ml kultur blandet med F/2-næringsmedie.

Vedlegg 18 viser liten vekst de første fire dagene, sannsynligvis var dette lag-fasen. De neste 4 dagene viser Vedlegg 19 at tettheten har økt betraktelig. Vedlegg 19 er tatt etter påfyll av F/2, så fargen har i utgangspunktet vært sterkere. Videre til 25. februar er det tydelig god vekst, med oppskalering til to 2 liters med 1600 ml av alle fire kulturene, som vist i Vedlegg 20. Fra 25. februar til 3. mars har alle kulturer blitt merkbart tettere. Neste oppskalering var 3. mars, hvor algene ble fordelt på 8 kolber med rundt 1 liter i hver, som vist i Vedlegg 21 og 22. Som følge av at *T.subdordiformis* klumpet seg på bunn, ble de fire kolbene satt på rørebrett. Fra 3. mars til 9. mars har fargen i alle kolber mørknet mer - særlig i den nærmeste

I.galbana-kulturen, som vist i Vedlegg 23. Det vises også stor fordampning i den respektive kulturen, samt i den ene *T.subcordiformis*-kulturen. Denne dagen ble det også, som Vedlegg 2 forteller, tilsatt F/2-medium opp til 2 l for alle kolber, men 3 dager frem i tid viser Vedlegg 24 likevel tette kulturer og relativt jevn fordampning. Neste dag (12. mars) viser Vedlegg 25 sterk farge i alle kulturer etter ny F/2-tilsetning til 2 l.



Figur 2: 4 2-liters kolber av *I.galbana* til venstre og 4 2-liters kolber av *T.subcordiformis* på rørebrett til høyre. Bildet er tatt 12 mars.

3.2 Fettsyrebestemmelse av *I.galbana* & *T.subcordiformis*

Prosentvis innhold av tørrvekt for navngitte fettsyrer hos begge arter, sammenlignet med procenter fra tidligere forskning (Serval *et al.* 1994, 692)(Liu *et al.* 2015, 286). Tallene som presenteres i tabellen fra dette forsøket er hentet fra fettsyrerapportene for *T.subcordiformis* og *I.Galbana* (Vedlegg 26 og 28). id = ingen data. (Tabell 1).

| Navngitte fettsyrer | <i>T.subcordiformis</i> (våre tall) | <i>T.subcordiformis</i> (Liu <i>et al.</i> 2015, 286) | <i>I.galbana</i> (våre tall) | <i>T.galbana</i> (Serval <i>et al.</i> 1994, 692) |
|--|--|---|---------------------------------|---|
| <i>Myristinsyre (C14:0)</i> | 7,7 | id | 1,5 | 16,8 |
| <i>Myristinsyre (C14:1)</i> | 3,9 | id | 3,3 | id |
| <i>Palmitinsyre (C16:0)</i> | 36,8 | 23,2 ± 0,1 | 38,9 | 11,1 |
| <i>Palmitoleic-syre (C16:1n-7)</i> | id | id | id | 5,1 |
| <i>Stearinsyre (C18:0)</i> | 22,5 | id | 20,2 | id |
| <i>Oleic- eller elaidicsyre (C18:1n-9)</i> | 7,1 | 6,7 ± 0,3 | 14,8 | 9,7 |
| <i>Vaksensyre (C18:1n-7)</i> | 1,6 | 4,7 ± 0,4 | 2,5 | id |
| <i>Linolsyre (C18:2n-6)</i> | 1 | 9,9 ± 0,1 | 3,3 | 7,8 |
| <i>α-linolensyre (C18:3n-3)</i> | 2,5 | 28,7 ± 0,1 | 5,4 | 16,3 |
| <i>Stearodinsyre (C18:4n-3)</i> | 0 | 4,8 | id | 19,8 |
| <i>Arakidsyre (C20:0)</i> | 1,8 | id | 1,6 | id |
| <i>Dihomogammalinolensyre (C20:3n-3)</i> | 1,2 | id | 0,3 | id |
| <i>Arakidonsyre (C20:4n-6)</i> | id | id | 0,4 | 0,6 |
| <i>EPA (C20:5n-3)</i> | 0,4 | 4,9 | 2,9 | 0,9 |
| <i>Behensyre (C22:0)</i> | 5,1 | id | 4,6 | id |
| <i>Erucinsyre (C22:1n-9)</i> | 0,4 | Id | 0,03 | id |
| <i>DHA (C22:6n-3)</i> | 8,1 | Id | id | 12 |
| <i>Tetracosanoic syre (C24:0)</i> | 0,04 | id | 0,1 | id |
| <i>(Navn? C24:1)</i> | id | id | 0,01 | id |

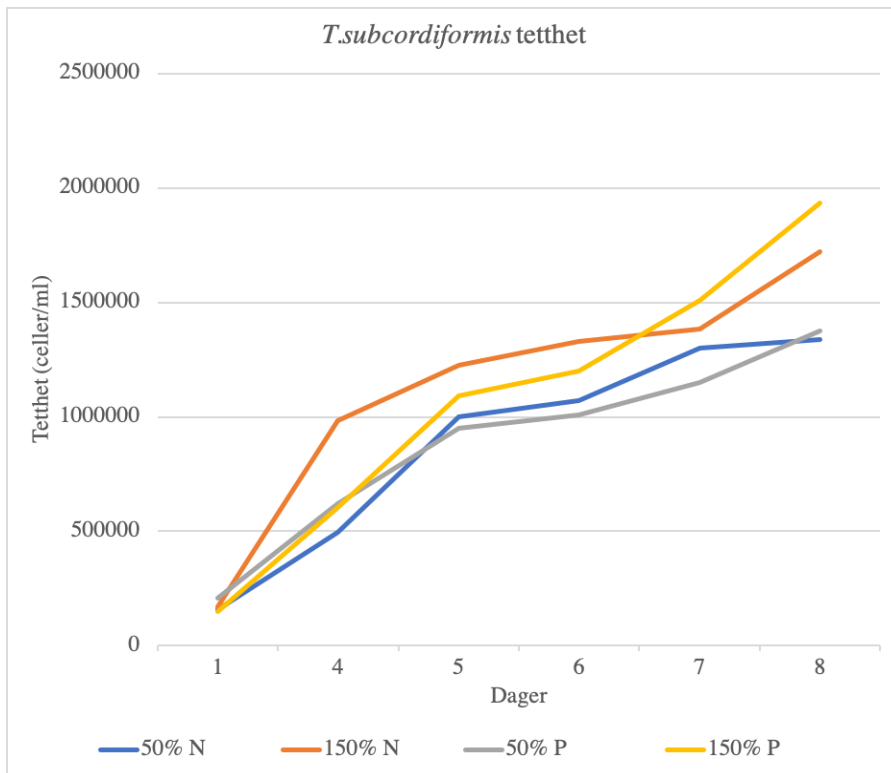
Forekomsten av fettsyrer for *T.subcordiformis* og *I.galbana* er visualisert i kromatogram (Vedlegg 27 og 29). Fettsyrebestemmelsene viser sprikende verdier når sammenlignet med tidligere forskning. Når det gjelder EPA-innholdet til *T.subcordiformis* var det mindre i dette forsøket med 0,4%, sammenlignet med 4,9% fra tidligere forskning. På den andre siden viste *I.galbana* et høyere innhold EPA enn resultatet til Serval *et al.* - 2,9% mot 0,9%, henholdsvis. For *T.subcordiformis* ble det verken i forsøket utført av J. Liu *et al.* eller boka “Plankton Culture manual” (Hoff and Snell 1987, 29) registrert DHA, men 8,1% ble registrert i dette

forsøket. Forsøket gjort av M.O. Serval *et al.* registrerte et høyt DHA-innhold på 12% hos *I.galbana*, men fettsyren ble ikke registrert i dette forsøket. Sammensatt ga fettsyrebestemmelse et PUFA-innhold på 21,6% av total lipidinnhold hos *I.galbana*, sammenlignet med 17% fra tidligere forskning (Serval *et al.* 1994, 286). For *T.subcordiformis* var det på 19,5%, sammenlignet med 46% fra tidligere forskning (Liu *et al.* 2015, 692).

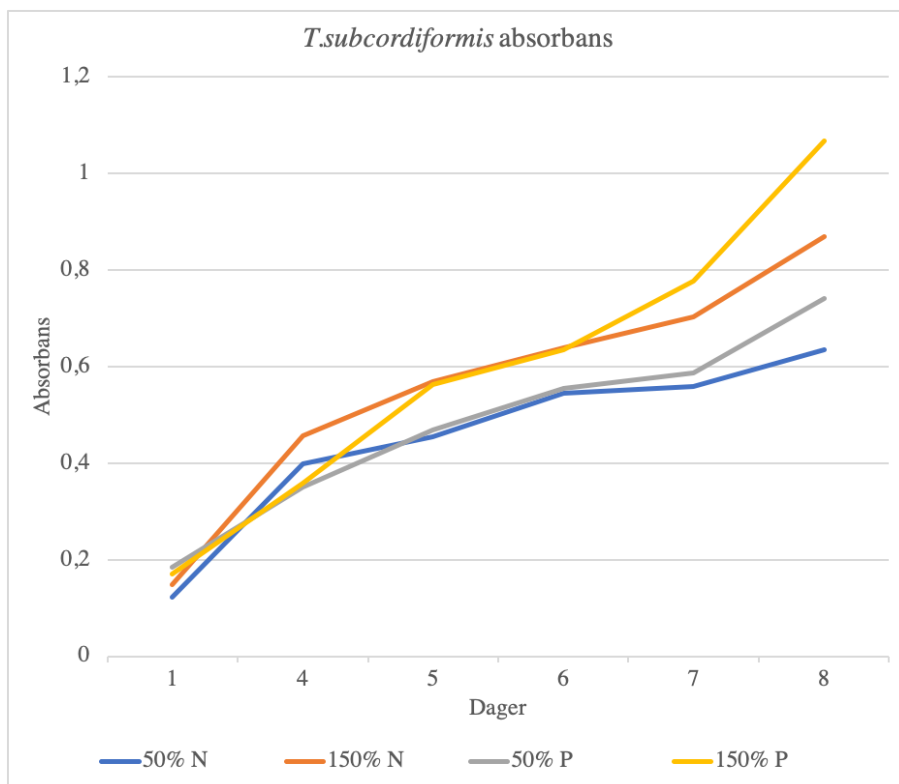
3.3 Vekst og fettsyresammensetning under næringsstress

Eksakt utregnet celler/ml og absorbansmålinger er presentert i tabeller, hvor Vedlegg 30 og 31 inneholder tetthet og absorbans for *T.subcordiformis*, og 32 og 33 inneholder tetthet og absorbans for *I.galbana*, henholdsvis.

I den første grafen (Figur 3) spriker det tydelig i vekst blant de ulike kulturene av *T.subcordiformis*. Kulturen med 150% N illustrerer en større vekst enn kulturen med 50% N, da det den siste dagen var 1,7 og 1,3 millioner celler per ml, respektivt. Tettheten til 150%-N-kulturen hadde i løpet av 8 dager en økning på 912%, mens kolben med 50% N viser en økning på 738%. Utviklingen av absorbans viser også en lignende utvikling, hvor kolben med 150% og 50% viser en økning fra 0,149 til 0,87 og 0,124 til 0,635 absorbans, henholdsvis. Kolbene med 150% og 50% P viser en lignende utvikling. Kolben med 150% P hadde størst vekst av alle fire kolbene med *T.subcordiformis*, med en tetthetsøkning på 1190%. På den åttende dagen viste kulturen nesten 2 millioner celler per ml, med en følgende absorbans på 1,068. Kulturen med 50% P startet med 210 000 celler/ml, som er en høyere tetthet enn de andre kolbene ved startstreken. Tetthetsøkning var på 555% til ca. 1,4 millioner celler/ml, med en absorbansøkning fra 0,185 til 0,741.

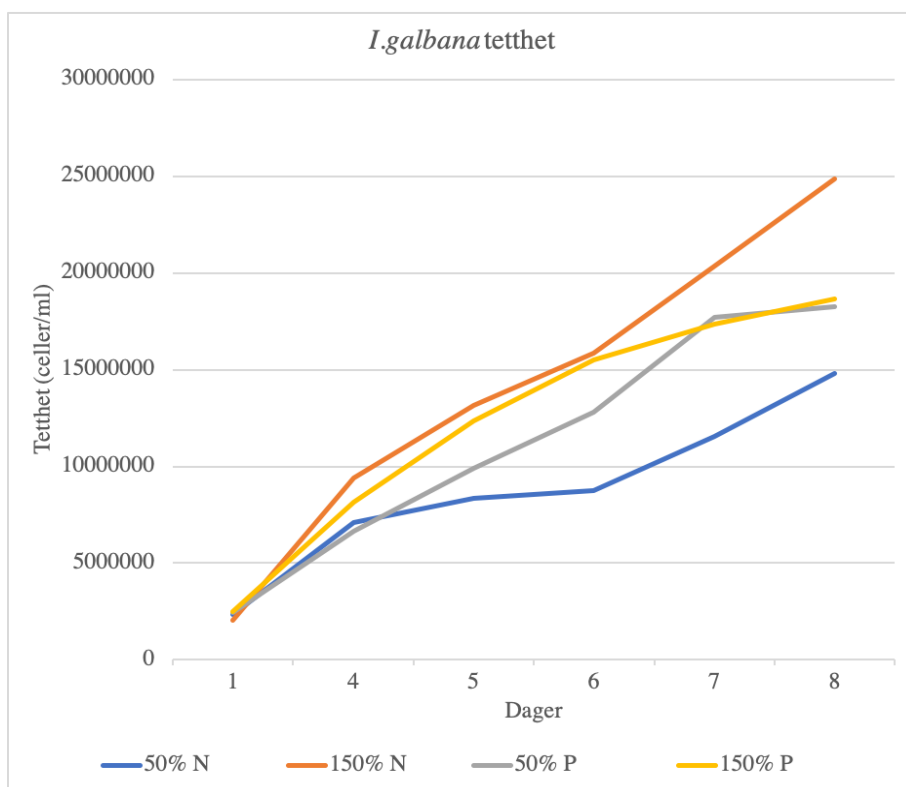


Figur 3: Utviklingen av tetthet (celler/ml) hos kulturer av *T.subcordiformis* over hele forsøketstidsforløp ved næringsstress.

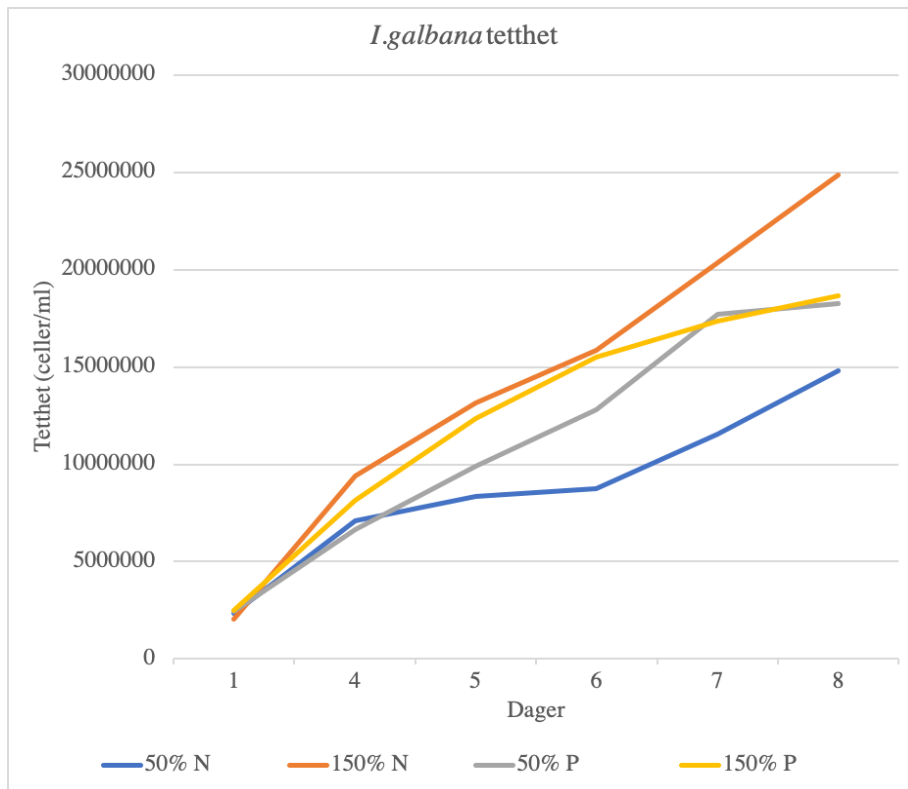


Figur 4: Utvikling av absorbans hos kulturer av *T.subcordiformis* over hele forsøketstidsforløp ved næringsstress.

Som hos de ulike kulturene med *T.subcordiformis*, var det hos *I.galbana* også sprikende vekst - særlig hos kulturene med ulike prosent av nitrogen. Som for *Tetraselmis*-kulturene var det stigende vekst i kolben med 150% N - mer enn det var med 50% N. I dette tilfellet var forskjellen tydelig. Kulturen med 150% N viser en tetthetsøkning på 1118%, fra ca. 2 til nesten 25 millioner celler/ml. Kulturen med 50% N viser en tregere vekst fra 2,36 til nesten 15 millioner celler/ml, som vil si en økning på 527%. Absorbans-målingene tyder korresponderende på en større absorbans hos 150% N enn 50% N, med 1,583 og 0,448 abs, henholdsvis. Grafene viser at veksten hos kulturene med ulikt innhold av fosfor er lik. De vokser jevnt og ender opp på ca. samme tetthet og absorbans. Kulturen med 150% P vokser 641% fra 2,52 til 18,68 millioner celler/ml, men en avsluttende absorbans på 1,393. Kulturen med 50% P vokste med 649% fra 2,44 til 18,27 millioner celler/ml, med en avsluttende absorbans på 1,385.



Figur 5: Utvikling av tetthet hos kulturer av *I.galbana* over hele forsøketstidsforløp ved næringsstress.



Figur 6: Utvikling av absorbans hos kulturer av *I.galbana* over hele forsøkets tidsforløp ved næringsstress.

4 Diskusjon

Gjennom den praktiske forsøkene vedrørende algedyrking har det blitt samlet en rekke resultater og nyttige erfaringer. Som nevnt innledningsvis er dette en problemstilling og et område innen det marine miljø som ble valgt både på grunn av eksisterende globale og nasjonale problemer, samt personlige ønsker om å lære algedyrking. Deltakernes ønsker og ambisjoner for å lære flere aspekt ved dyrkingen var en essensiell faktor for å oppnå praktisk framgang på laboratoriet, som i sin tur ble et grunnlag for hvordan vi skulle utvikle oppgaven i sin helhet med suksess. Dyrking av *T.subcordiformis* og *I.galbana* i kulturer ble utført av studentene i liten skala i 2. semester av bachelorgraden, i 2019 med samme metode.

4.1 Oppskalering

Tatt i betraktning at kulturene ble dyrket og holdt i live på laboratoriet i over to måneder, medførte det store tidsrommet kontinuerlig økt kompetanse, hvilket effektiviserte og optimaliserte arbeidet. Bildene som er tatt jevnlig av kulturene med økende fargekontrast og oppskaleringen hos begge arter i første del av forsøket visualiserer god vekst i kolbene. Det er

vanskelig å si om veksten har vært eksponensiell, da det ikke ble utført jevnlig tellinger og absorbansmålinger under oppskaleringene. Tiden det tar for kulturer å stabilisere seg varierer med størrelsen av kultur og næringsinnhold. Det må nevnes at slike kurver (Figur 1) utvikles når en kultur vokser i samme kolbe hele tiden. I vårt tilfelle var målet som nevnt å oppskalere så mye som mulig, og dermed ble det fylt på mer F/2-mediet eller oppskalert til større kolber når fargen til kulturene var sterk. Med tanke på at figurene i Vedlegg 18-25 visualiserer relativt sterk farge gjennom store deler av prosessen, kan det tyde på en jevn og god lineær, og til tider eksponentiell vekst, men dette er spekulativt. Veksten kunne vært bedre representert med tellinger og absorbansmåling, men på den andre siden ble det jevnlig oppskalert og tilsatt F/2, så en modellering av veksten ville vært krevende. Videre oppskalering hadde vært mulig med større beholdere.

Til tross for stor vekst jevnlig gjennom hele måneden med dyrking, var det flere feilkilder. Ulike feil av deltakere og feil ved metodene anvendt påvirket utvilsomt kulturenes evne til optimal vekst, til en viss grad. En sentral feilkilde var da kolbene i Vedlegg 20 ikke ble sterilisert med autoklav før bruk. Dette kan ha vært en kontamineringskilde, men kulturene fortsetter å vokse til tross for denne feilen. En ukes tid etter skifte til nye og steriliserte kolber som vist i Vedlegg (21), oppsto det et hull med klor rundt åpningen i en av kulturene til *I.galbana*. Dette har antakelig trykk fra oksygene mikroalgene produserer gjennom fotosyntesen. En annen feilkilde som oppsto regelmessig var fortetning av luftslangene. I denne delen ble som nevnt ikke veksten målt gjennom celletellinger og absorbans.

Det var begrensede muligheter for å optimalisere abiotiske faktorer som pH, salinitet, lys og temperatur for hver art. Algene ble dyrket i romtemperatur, men det må nevnes at utetemperaturen har påvirket romtemperaturen, da det til tider var over 15 grader ute og ned til flere minusgrader. Det har hele tiden holdt seg innenfor grenseverdiene for artenes temperaturområder, men med tanke på deres optimale intervaller kan dette ha begrenset veksten. For det andre har kilden for sjøvann vært konstant den samme. Salinitet ble ikke prioritert for manipulasjon, da sjøvannets salinitet trolig jevnlig lå rundt 35 promille.

Plasseringen av kolbene inne på laboratorium ga to lyskilder - lysrør og naturlig lys gjennom vinduet. At *T.subcordiformis*-kulturene sto på et kvadratisk Brett, medførte ujevn fordeling av lysintensitet. Til tross for at de fikk god eksponering til naturlig sollys fra den andre siden er ikke det indirekte sollyset like intenst, ergo kan dette oppsettet ha påvirket vekst hos *T.subcordiformis*. Det er også verdt å merke seg lengde på dagene, da det er stor forskjell mellom starten av februar og slutten av april. Mot slutten av april ble det flere lyse timer, i

overkant av 4 timer mer sollys. LED-lyset var uansett mer intenst og konstant, så det indirekte sollyset har ikke påvirket kulturene i stor grad.

4.2 Fettsyrebestemmelse av *I.galbana* og *T.subcordiformis*

Fettsyresammensetningen var sprikende fra tidligere forsøk. Av lipidene i cellen er det flerumettede fettsyrer en er ute etter i høykost- og fôrnæringen. Det er en rekke potensielle årsaker til forskjellene mellom forsøket og tidligere forskning. Det er sannsynlig at tørrstoffet som ble veid og valgt til analyse inneholdt mye salt og “støy” som følge av at tørrstoffet ikke ble filtrert. Det vil si at mengdene av fettsyrer i tørrstoffet ikke ble så konsentrerte som de egentlig er, ergo ga ikke resultatene fra gasskromatografen en presis oversikt for fettsyrene. På en annen side anvendes det mange forskjellige metoder for lipid ekstraksjon av cellene før transesterifikasjon, som skaper problemer i henhold til sammenligning av fettsyrebestemmelser og resulterer i mangfoldige variasjoner for fettsyresammensetning (Liu *et al.* 2015, 284). For å fremstille oppgavens resultater på en måte som reflekterer annen forskning er det sammenlignet med forsøk hvor metode er helt lik eller nokså lik (Liu *et al.* 2015, 285) (Serval *et al.* 1994, 692) (Branco-Vieira *et al.* 2017, 5) (Folch, Lees, and Sloane 2021, 497-508). Det må tas rede for at skolens standarder i gasskromatografen ikke dekker alle karbonkilder oppdaget. For eksempel viser tidligere fettsyrebestemmelser at *T.subcordiformis* og *I.Galbana* inneholder rundt 4,8- og 19,8% av omega-3-fettsyren stearidonsyre (Liu *et al.* 2015, 286)(Serval *et al.* 1994, 692), men denne ble ikke registrert i noen av forsøkene. Standarder satt av skolen resulterte i at relativt store prosentandeler av både *I. galbana* og *T.subcordiformis* sine analyser var ugjenkjennelige for maskinen og ble notert som “støy”. I uvitenhet er det ikke mulig å identifisere hva disse prosentandelene i realiteten er, men det kan spekuleres på om at støyet med høy prosent er fettsyrer. Som nevnt innledningsvis kan lys påvirke fettsyresammensetningen, og kulturene stod eksponert til den naturlige lyssyklusen som fra februar til mars blir lengre og mer intens. Dette kan ha hatt innflytelse på metabolismen og fettsyrekomposisjonen. Det må også nevnes at dette var første gangen det ble gjort fettsyrebestemmelser av lipider fra mikroalger ved NTNU i Ålesund, som vil si at uerfarenhet kan ha påvirket resultatet. Mengden lipider fra tørrstoff var liten, så til videre forskning bør det veies en større mengde tørrstoff.

4.3 Vekst og fettsyresammensetning ved næringsstress

For dette forsøket var det ikke muligheter for å bruke direkte paralleller til sammenligning. Grunnen er at det i forsøkene det sammenlignes med blant annet er større volumer og flere kultiveringsdager (Javad Zarrinmehr et al. 2019, 155)(Huang et al. 2012, 129)(Yingying and Changhai 2009, 226). Grafene fra dette forsøket viser tydelig forskjell i vekst hos de ulike kulturene. I disse grafene må det nevnes at dag to og tre var en lørdag og søndag, så det ble ikke telt eller målt absorbans her. Hadde det derimot blitt målt disse to dagene hadde ikke linjene vært så bratte som grafene viser. Som forventet i henhold til tidligere forskning for *T.subcordiformis* ga både økt innhold av nitrogen og fosfor større vekst enn i kulturene med reduserte verdier (Huang *et al.* 2012, 131). Resultatene for *I.galbana* sin vekst var derimot mer overraskende. Kulturene med 50- og 150% N samsvarte med forventningene (Javad Zarrinmehr *et al.* 2019, 153), men på den andre siden var det uventet at kulturene med 50% og 150% P hadde relativt like vekstkurver. Dette avviker fra tidligere forskning der økning av fosfor gir bedre vekst enn reduksjon (Yingying and Changhai 2009, 227) (S.M. 2019, 364). Generelle tilfældigheter kan være årsaker til dette avviket. Unøyaktige tellinger og absorbansmålinger er andre mulige feilkilder. På den andre siden viser både grafen for tetthet og absorbans relativt like resultater, så sannsynligheten for at dette er årsaken svekkes. Hvis kultiveringen hadde foregått over lengre tid ville resultatene trolig vist videre spredning i vekst, da kolbene med redusert innhold av nitrogen og fosfor etterhvert ville gått tom for disse næringsstoffene. Mulighetene for kontaminasjon er mange gjennom dyrkingen og dette vil være en plausibel årsak til redusert vekst. Tilsynelatende kan kulturen med 150% P ha blitt kontaminert under håndtering, slik som tellinger, tilsetnings av F/2 eller overførsel fra morkulturen. I morkulturen antas det at flere celler var døde, da disse kulturene hadde stått over flere uker, nesten uhåndtert. Et scenario er derfor at kulturen med 150% P har fått en større prosent av døde celler.

Fettsyrebestemmelsen i dette forsøket ble ikke gjennomført, men erfaringen fra celledtelling, absorbansmålinger og visuelle undersøkelser ga mersmak hos begge deltakere, med gjensidig økt kompetanse for algedyrking. Forhåpentligvis hadde fettsyrebestemmelsen presentert økte lipid mengder i kulturene med redusert nitrogen- og fosforinnhold, da dette ser ut til å være trenden.

Under celledtelling i mikroskop og måling av absorbans i spektrofotometer kan det ha oppstått flere feilkilder. Ved telling av celler var det tilfeller hvor deltakere telte ulike ruter i

tellekammeret. Cellene i seg selv ba på et par problemer for presis telling. *T.subcordiformis* viste tendenser til å klumpe seg sammen. For *I.galbana* dukket det opp problem for nøyaktig telling fordi cellene var så små at synet slet med å oppdage alle. Denne arten kunne blande seg med strekene for rutene i tellekamrene, og ettersom kamrene var tredimensjonale kunne cellene legge seg over hverandre.

Ved overførsel av kultur over i kyvetter før de ble målt for absorbans i spektrofotometer kunne celler synke raskt ned mot bunnen av kyvetten. Det var kort tid og distanse mellom kulturenes oppholdssted og hvor spektrofotometeret ble oppholdt, men det var synlig at noen celler for spesielt *T.subcordiformis* sank ned til bunnen av kyvetten. Cellene sank tydelig visuelt på grunn av artens grønne farge som la seg ned.

4.4 Situasjonen i Norge

I Norge ser det ut til at interessen i mikroalgenes flerfoldige potensial er stort, men det foreligger begrensninger og utfordringer i veien før markedet ser kommersiell vekst. Det er et større potensial for mikroalger som høykost-produkt i Norge enn det som er tilgjengelig nå. Hvorfor har ikke flere aktører satset og investert i dette, og hva må til for kommersiell vekst?

I Norge er det generelt formodentlig gode muligheter for mikroalgeproduksjon. Med tilgang på rent sjø- og ferskvann, rimelig elektrisitet og verdensledende kunnskap og teknologi innen akvakultur, kan Norge bli en konkurransedyktig produsent og innovatør. For dyrking av mikroalger er den billigste metoden naturlig dyrking i åpne dammer, men er det anvendelig i Norge? Globalt er de største produsentene av mikroalger i områder med rikelig og jevn tilgang på sollys og varme. Dette er ikke situasjonen i Norge, med tanke på at lys, temperatur, salinitet og næring varierer gjennom årstidene. For å lykkes med algedammer i Norge måtte det vært med arter som er tilpasset det nordiske klimaet. Forskning viser at mikroalger øker produksjonen av lipider som DHA og EPA i forsvar mot reduksjon av næring, lys og temperatur (Cherigi *et al.* 2019, 442). Dette kan være en fordel for åpne produksjonssystemer i Norge, men her vil en ikke oppnå maksimal biomasse - heller rikelig med nyttige fettsyrer. Åpne systemer produserer per nå større mengder biomasse og kostnadene vil være lavere enn i et innendørs anlegg. Denne typen krever også større arealer. En annen mulighet er produksjon i fotobioreaktorer. Her er risikoen for kontaminasjon i åpne systemer høyere enn i lukkede systemer. Det er betydelig lettere å holde en fotobioreaktor ren, som igjen kan gi et produkt av høyere kvalitet. Produksjon i fotobioreaktorer er dyrere enn i dammer, som nevnt

innledningsvis, fordi det krever store mengder strøm til kontinuerlig lys og sirkulasjon. I Norge er det dessuten relativt lave strømpriser, men i vintersesongen går disse kostnadene opp. Det norske selskapet MicroA har med andre arter av mikroalger suksessfullt vist evnen til å konkurransedyktig kommersielt produsere og selge høyverdige produkter av mikroalger i fotobioreaktor (Andersen 2015). En verdifull fordel med en fotobioreaktor er større mulighet for manipulasjon. Det vil være lettere å kontrollere lysforhold, salinitet, pH, temperatur og diskuterbart næringsinnhold i vekstmediet. Som tidligere bevist kan flere av disse faktorene forstyrre vekst og celleoppbygging til aktørens fordel. Andre fordeler med fotobioreaktorer er helårsproduksjon og relativt lite areal sammenlignet med dammer. Et innendørs anlegg vil presumptivt gi høyere kostnader, men et bedre og renere produkt.

Muligheten for produksjon av heterotrofe alger er også tilstede. Metoden har potensialet til å oppnå stor vekst, høy celletetthet, i tillegg til å kunne produsere ettertraktede oljer. Metoden er dog kostbar, men kan med videre innovasjon, rimeligere karbonkilder og genredigering være attraktivt (Liu, Sun, and Chen 2014, s. 1).

Mikroalger har allerede vist seg å være populært i et nisjemarked hvor kundene er på utkikk etter sunne, bærekraftige og vegetariske matkilder. Mikroalger selges i sunnkost-butikker i Norge, men er produsert i andre land, som Kina, Nederland og England. Hvorfor er ikke dette produsert i Norge? En sentral årsak er at mikroalger som høykost-produkt enda ikke attraktivt nok på de store markedene, som gjør at det er begrenset med interesserte aktører og investeringer i næringen. Dette henger presumptivt sammen med generelt høye produksjonskostnader. Andre årsaker handler om lite kunnskap om mulighetene til matlaging og fordelene ved konsum av mikroalger blant allmennheten. Det er tydelig mer investeringsvilje i mikroalger som føringrediens og biodrivstoff. Det er nødt til å forskes mer på og investeres i produksjonsteknologien for å redusere kostnadene. Det er også nødvendig at produktene markedsføres på riktig måte, hvor fordelene med organismene tydelig må presenteres. Fokuset rundt hvordan mikroalger kan være etiske og bærekraftige alternativer for en rekke kosttilskudd, samt fordelene ved at mikroalger er primærprodusenter burde presiseres. Essensielle omega-3 fettsyrer fra fisk er et populært høykost-produkt. Det er dog ikke fisken som er ansvarlig for disse fettsyrene, men mikroalger, som frakter disse oppover i næringskjeden. I tillegg er risikoen for konsum av tungmetaller betraktelig mindre med mikroalger enn hos eksempelvis laks og krabbe, da disse hopper seg opp jo lengre opp i næringskjeden det konsumeres. Populariteten rundt mikroalger som omega-3-produkt vokser

nasjonalt og internasjonalt parallelt med økende fokus på etiske, bærekraftige og sunne kilder til nødvendige næringsstoffer. Dette er et område hvor norskproduserte alger kan ha et godt potensialet internasjonalt, da deler av verden - særlig land som Japan og Sør-Korea, ser på norskproduserte råvarer som rene. En utfordring med mikroalger til “direkte” konsum, som pulver, er kjedelig eller lite attraktiv smak og lukt. Algene som tillagt sunn ingrediens i for eksempel pasta og brød kan bli attraktivt, og er som nevnt allerede testet ut.

Det økonomiske aspektet for dyrking av mikroalger er enda ukjent, med manglende data for produksjonskostnader og konkret, kommersielt potensial for ulike produkt. Store variasjoner i produksjonsutstyr- og metode, kultivert art, næringsmiddel og strømkapasitet er avgjørende årsaker til vanskelighetene for å sammenligne produksjoner. Globalt sett er det også forskjeller i volum av biomasse produsert og solgt pakkevis, som vist i Tyskland. Selv om arter av biomasse ikke er spesifisert, er det på det tyske markedet tydelige variasjoner i pris for mikroalger. I enkelte tilfeller skyldes prisdifferansen mengde, mens i andre tilfeller var det ingen forklarlige årsaker til den store prisdifferansen (Schade and Meier 2021, s. 8-9). Den nasjonale situasjonen hvor de fleste produksjoner av mikroalger utføres på en basis og hensikt av forskning, med noen få suksessfullt, kommersielle selskap er det mange variasjoner som gjør det vanskelig å sammenligne kostnader og lønnsomhet. Kulturene som dyrkes av ulike institutt omkring i landet er gjerne i mindre skala eller utført over kort tidsperiode, i likhet med denne oppgaven. Utenom disse finnes det få etablerte selskap eller startups som kontinuerlig driver produksjon av mikroalger med store mengder biomasse. Distinkte forskjeller ved trinnene for produksjon kan forstås som en av grunnene til at lønnsomhetsundersøkelser og økonomisk potensiale av mikroalge-dyrking til ulike produkt er uklart. Det bør utredes både økning i produksjonskapasitet og minskelse i produksjonskostnader for at produksjon av mikroalger skal være konkurransedyktige i de respektive markedene, enten det er biodrivstoff, kosmetikk, kosttilskudd, ingrediens i fôr eller andre produkt. Mangelen av data på kost for produksjonsutstyr, lokale, elektrisitet og ressurser er viktige aspekt hvor det må skaffes mer informasjon for å overkomme utfordringene av å dyrke mikroalger kommersielt .

Andre direkte tiltak som umiddelbart kan utgjøre en netto positiv forandring i produksjonskostnadene er å utnytte allerede eksisterende kilder for CO₂, vann, uorganiske næringsstoffer og restvarme. Det finnes mange fabrikker og industriparke fungerer som kilde for dette. Fasiliteter i både Norge, Sverige og Finland har funnet måter for å utnytte

avfallsressurser, avfallsvarme og avløpsvann fra andre fabrikker, til fordel for produksjon av mikroalger (Cherigi *et al.* 2019, 445). Videre utnyttelse av overskuddet som blir igjen fra andre fabrikker resulterer i bedre ressursutnyttelse, mer bærekraftig produksjon og betraktelig lavere produksjonskostnader for produsentene av mikroalger. Det er estimert at mikroalger bruker omtrent 1,83 kg CO₂ per 1 kg biomasse (tørrvekt) (Christi 2007, 297). Fra et miljømessig perspektiv er utnyttelse av avfallsgass en tydelig form for karbonfangst.

6 Konklusjon

Internasjonalt er det lagt et solid grunnlag av forskning for *I.galbana* og *T.subcordiformis*, spesielt i henhold til artenes rolle som ingrediens i fôr til organismer innen akvakultur og som biodrivstoff. Innholdet av lipider, proteiner og vitaminer kan utgjøre en rolle ernæringsmessig humant. Generelt i Norge er det en økende interesse for mikroalgens ulike bruksområder på grunn av deres rike næringsinnhold og hyppige vekst. Mikroalger til humant konsum selges på nisjemarked som høykost-produkt, hovedsakelig i form av omega-3-tilskudd. Norge kan ha flere konkurransefortrinn for dyrking av mikroalger - gode naturlige forutsetninger, generelt god kunnskap angående teknologi i akvakultur og matproduksjon, samt investeringsvilje. Det er uklart hvilken produksjonsmetode som har størst potensiale, men både innendørs og utendørs produksjon kan være anvendelig i Norge. Når det gjelder produksjon av mikroalger som høykost-produkt er trolig fotobioreaktorer mest egnet, grunnet redusert risiko for kontaminasjon. Dersom produksjonen kombineres med restvarme, restgass og/eller avløpsvann, foreligger det muligheter for suksessfull, kommersiell produksjon. Samtidig er det viktig å påpeke behovet for videre investeringer i forskning, teknologi og markedsføring av mikroalgers ernærings- og miljømessige fordeler.

7 Referanser

Andersen, Ina. 2015. "I disse tankene vokser det som kan bli Norges nye milliard-næring."

TU, Januar 23, 2015.

<https://www.tu.no/artikler/i-disse-tankene-vokser-det-som-kan-bli-norges-nye-milliard-naering/223615>.

Animalia. 2019. "Hvordan skal vi produsere nok mat til en voksende befolkning?" Animalia.

<https://www.animalia.no/no/animalia/aktuelt/barekraft/>.

Barthel, Knut, and Universitetet i Bergen. 2018. "saltholdighet." Store norske leksikon.

<https://snl.no/saltholdighet>.

Biofuel Digest. 2012. "Who's in the lead? Algae around the world." Biofuelsdigest.

<https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2012/01/12/whos-in-the-lead-algae-around-the-world/>.

bodylab.no. n.d. "Bodylab Vegan Omega 3 (90 stk)." bodylab.no. Accessed Mai, 2021.

https://www.bodylab.no/shop/vegan-omega-3-3723p.html?gclid=Cj0KCQjw7pKFBhDUARIsAFUoMDbX3CGJmUBZaoKcObv_igRyPwh_DhyuNLehc8J7tHuRyNZu4T10WyQaAg_KEALw_wcB&gclsrc=aw.ds.

Branco-Vieira, Monique, Sergio San Martin, Cristian Agurto, Marco A. dos Santos, Marcos

A. Freitas, Teresa M. Mata, António A. Martins, and Nidia S. Caetano. 2017.

"Potential of *Phaeodactylum tricornutum* for Biodiesel Production under Natural Conditions in Chile." *Energies* 11, no. 1 (Desember): s. 54.

<https://doi.org/10.3390/en11010054>.

Chamberlain, Logan. 2020. "Total Population of the World by Decade, 1950-2050."

Infoplease.com.

<https://www.infoplease.com/world/population/total-population-world-decade-1950-2050>.

Chen, Bailing, Chun Wan, Muhammad Amer Mehmood, Jo-Shu Chang, Fengwu Bai, and

Xinqing Zhao. 2017. "Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review."

Bioresour. Technol. 244, no. 2 (Mai): s. 1198-1206.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.170>.

Cherigi, Otilia, Susanne Ekendhal, Johan Engelbrektsson, Niklas Strömberg, Anna Godhe, and Cornelia Spetea. 2019. "Microalgae biotechnology in Nordic countries – the potential of local strains." *Special Issue: Photosynthesis* 166, no. 1 (Mai): s. 442-445. <https://doi.org/10.1111/ppl.12951>.

Christi, Yusuf. 2007. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances* 25, no. 3 (Juni): 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

CO2BIO AS. n.d. "CO2BIO AS." CO2BIO. Accessed Februar, 2021. <https://www.co2bio.no/>.

Costello, Christopher, Ling Cao, Stephan Gelcich, and et al. 2020. "The future of food from the sea." *Nature* 588, no. 7836 (August): s. 95-100. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2616-y>.

Delrue, F., P. A. Setier, C. Sahut, L. Cournac, A. Roubaud, G. Peltier, and A. K. Froment. 2012. "An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae." *Bioresource Technology* 111 (Februar): s. 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.020>.

Farag, Ihab, and K. Price. 2013. "Resources Conservation in Microalgae Biodiesel Production." *International Journal of Engineering and Technical Research* 1, no. 8 (Oktober): s. 49-56. https://www.researchgate.net/publication/259868136_Resources_Conservation_in_Microalgae_Biodiesel_Production.

FjordAlg AS. 2018. "FjordAlg AS." FjordAlg. <https://www.fjordalg.com/index.php/en/>.

FN. 2019. "Befolkning, migrasjon og urbanisering." FN.

<https://www.fn.no/tema/fattigdom/befolkning>.

Folch, Jordi, M. Lees, and Stanley G. Sloane. 2021. "A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES." *Journal of Biological Chemistry* 226, no. 1 (Januar): s. 497-509.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).

Glimja. n.d. "OPTI3 COMPLETE OMEGA 3." glimja.no. Accessed Mai, 2021.

https://glimja.com/no/produkt/opti3-complete-omega-3/?gclid=Cj0KCQjw7pKFBhDUA RIsAFUoMDaAemNml6m4VvuSkskrUoIZcFezDCSL7PxiiTRJ7IcK785yRm-svBAaAk ZTEALw_wcB.

Guedes, Ana C., Helena M. Amaro, and Francisco X. Malcata. 2020. "Microalgae as Sources of Carotenoids." *Marine Drugs* 9, no. 4 (April): s. 625-644.

<https://doi.org/10.3390/md9040625>.

Havlandet Marin Yngel AS. n.d. "Landbasert produksjon av marine arter." INCGruppen. Accessed Februar, 2021.

<https://www.incgruppen.no/akvakultur/havlandet-marin-yngel/>.

Hoff, Frank H., and Terry W. Snell. 1987. *Plankton Culture*. Sixth ed. Dade City, Florida: Florida Aqua Farms.

Hofstad, Knut. 2018. "lux." Store norske leksikon. <https://snl.no/lux>.

Huang, Xuxiong, Zhengzheng Huang, Wen Wen, and Jiaqi Yan. 2012. "Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty

acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*)." *Journal of Applied Phycology* 25, no. 1 (Mai): s. 129-137. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9846-9>.

Javad Zarrinmehr, Mohammad, Omidvar Farhadian, Fatemeh Paykan Heyrati, Javad Keramat, Eleni Koutra, Michael Kornaros, and Ehsan Daneshvar. 2019. "Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*." *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 46, no. 2 (November): s. 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>.

Ji, Chao-Fan, Xing-Ju Yu, Zhao-An Chen, Song Xue, Jack Legrand, and Wei Zhang. 2011. "Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*." *International Journal of Hydrogen Energy* 36, no. 10 (Mars): s. 5817-5821. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.138>.

Khan, Muhammad I., Jin H. Shin, and Jong D. Kim. 2018. "The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products." *Microbial Cell Factories* 17, no. 36 (Mai): s. 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.

Kjetland, Anders. 2016. "UiB bygger pilotanlegg for mikroalgedyrking på Mongstad." Universitetet i Bergen. <https://www.uib.no/aktuelt/97364/uib-bygger-pilotanlegg-mikroalgedyrking-p%C3%A5-mongstad>.

Krishna Koyande, Apurav, Kit W. Chew, Krishnamoorthy Rambabu, Yang Tao, Dinh-Toi Chu, and Pau-Loke Show. 2019. "Microalgae: A potential alternative to health

supplementation for humans.” *Food Science And Human Wellness* 8, no. 1 (Mars): s.

16. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453018301435>.

Kyst.no. 2019. “Produksjon av algefôr skalesopp.” Kyst.

<https://www.kyst.no/article/produksjon-av-algefr-skalesopp/>.

Liu, Jiao, Yanan Liu, Haitao Yang, and Song Xue. 2015. “Direct transesterification of fresh microalgal cells.” *Bioresource Technology* 176 (Januar): s. 284-287.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.094>.

Liu, Jin, Zheng Sun, and Feng Chen. 2014. “Chapter 6 - Heterotrophic Production of Algal Oils.” *Biofuels from Algae* 1, no. 1 (Januar): s. 111-142.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00006-1>.

Metting Jr, F. B. 1996. “Biodiversity and application of microalgae.” *Journal of Industrial Microbiology* 17 (November): s. 477-489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>.

NIBIO. 2017. “Samarbeidsavtale med Pilotgård Algeproduksjon Folvengaard.” NIBIO.

<https://www.nibio.no/prosjekter/algae-to-future-a2f/samarbeidsavtale-med-pilotg%C3%A5rd-algeproduksjon-folvengaard>.

Nofima, NTNU, Skretting ARC, and Trine Ytrestøyl. 2020. “Pigmentering i laks.” Nofima.

<https://nofima.no/prosjekt/pigmentering-i-laks/>.

Norsker, Niels-Henrik, Maria J. Barbosa, Marian H. Vermuë, and René H. Wijffels. 2011.

“Microalgal production — A close look at the economics.” *Biotechnology Advances* 29, no. 1 (Februar): s. 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>.

Raja, Rathinam, Hemaiswarya Shanmugam, Venkatesan Ganesan, and Isabel S. Carvalho.

2014. "Biomass from Microalgae: An Overview." *Journal of Oceanography and Marine Research* 2, no. 1 (Februar): s. 7.

<https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000118>.

Richie, Hannah. 2019. "The world now produces more seafood from fish farms than wild catch." ourworldindata.org. <https://ourworldindata.org/rise-of-aquaculture>.

Ritchie, Hannah, and Max Roser. 2019. "Land Use." *Our World in Data* 1, no. 1 (September): s. 10. <https://ourworldindata.org/land-use#citation>.

Sajjadi, Baharak, Wei-Yin Chen, Abdul A. Abdul Raman, and Shaliza Ibrahim. 2018.

"Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97 (Desember): s. 200-232.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>.

Schade, S., and T. Meier. 2021. "Techno-economic assessment of microalgae cultivation in a tubular photobioreactor for food in a humid continental climate." *Clean Technologies and Environmental Policy*, (Februar), s. 1-18.

<https://doi.org/10.1007/s10098-021-02042-x>.

Servel, Marie-Odile, C. Claire, A. Derrien, L. Coiffard, and Y. De Roeck-Holtzhauer. 1994.

"Fatty acid composition of some marine microalgae." *Phytochemistry* 36, no. 3 (Juni): s. 691-693.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8)[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8).

Skarstad Egeland, Einar. 2018. "Absorbans." Store norske leksikon.

[https://snl.no/absorbans_\(ekstinksjon\)_-_kjemi](https://snl.no/absorbans_(ekstinksjon)_-_kjemi).

S.M., Mohy E. 2019. "Accumulation of Lipids and Triglycerides in Isochrysis Galbana under nutrient stress." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 189, no. 2019 (April): s.

359-373. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02997-0>.

Suen, Yu, J. S. Hubbard, G. Holzer, and T. G. Tornabene. 1987. "TOTAL LIPID PRODUCTION OF THE GREEN ALGA NANNOCHLOROPSIS SP. QII UNDER DIFFERENT NITROGEN REGIMES1." *Journal of phycology* 23, no. s2 (Juni): s.

289-296. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04137.x>.

Sunkost. n.d. "Supernature Chlorellapulver." sunkost.no. Accessed Mai, 2021.

<https://sunkost.no/sunn-mat/supermat/alger/supernature-chlorellapulver>.

Tan, J. S., S. Y. Lee, K. W. Chew, M. K. Lam, J. W. Lim, and S.-H. Ho. 2020. "A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids." *Bioengineered* 11, no. 1 (Januar): s. 116-129.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>.

Thronsen, Jahn, and Carmelo R. Tomas. 1997. "Chapter 5 - The Planktonic Marine Flagellates." In *Identifying Marine Phytoplankton* 1, no.1: s. 591-729. Cambridge, Massachusetts: Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-012693018-4/50007-0>.

Tillberg, J.-E-, and J. R. Rowley. 2006. "Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *Scenedesmus*." *Physiologia Plantarum* 75, no. 3 (April): s. 315-324. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb04633.x>.

Torres-Tiji, Yasin, Francis J. Fields, and Stephen P. Mayfield. 2020. "Microalgae as a future food source." *Biotechnology Advances* 41, no. 1 (Juli-August): s. 3. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>.

UiO Institutt for Biovitenskap. 2011. "Lysmåling." UiO. <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/l/lysmaaling.html>.

UiO Institutt for biovitenskap. 2011. "Trofisk nivå." UiO. <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/t/trofisk.html>.

UN. n.d. "Worldwide food waste." UN Environment. Accessed Mars, 2021. <https://www.unep.org/thinkeatsave/get-informed/worldwide-food-waste>.

United States Food & Drug Administration. 2020. "BAM R40: Lugol's Iodine Solution." FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-r40-lugols-iodine-solution>.

University of Waterloo. n.d. "F/2 Medium using filtered seawater or artificial seawater." University of Waterloo. <https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/f2>.

vitusapotek. n.d. "Vegetabilsk Omega-3 fra alger 30 kapsler." vitusapotek.no. Accessed Mai, 2021. <https://www.vitusapotek.no/kosthold-og-kosttilskudd/tran-og-omega-3/vegetabilsk-omega-3-fra-alger-30-kapsler-30-stk/p/950196>.

Yao, Changhong, Jiangning Ai, Xupeng Cao, Song Xue, and Wei Zhang. 2012. "Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation." *Bioresource Technology* 118 (Mai): s. 438-444.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.030>.

Yingying, Sun, and Wang Changhai. 2009. "The Optimal Growth Conditions for the Biomass Production of *Isochrysis galbana* and the Effects That Phosphorus, Zn²⁺, CO₂, and Light Intensity Have on the Biochemical Composition of *Isochrysis galbana* and the Activity of Extracellular CA." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14, no. 2

(April): s. 225-231. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0013-8>.

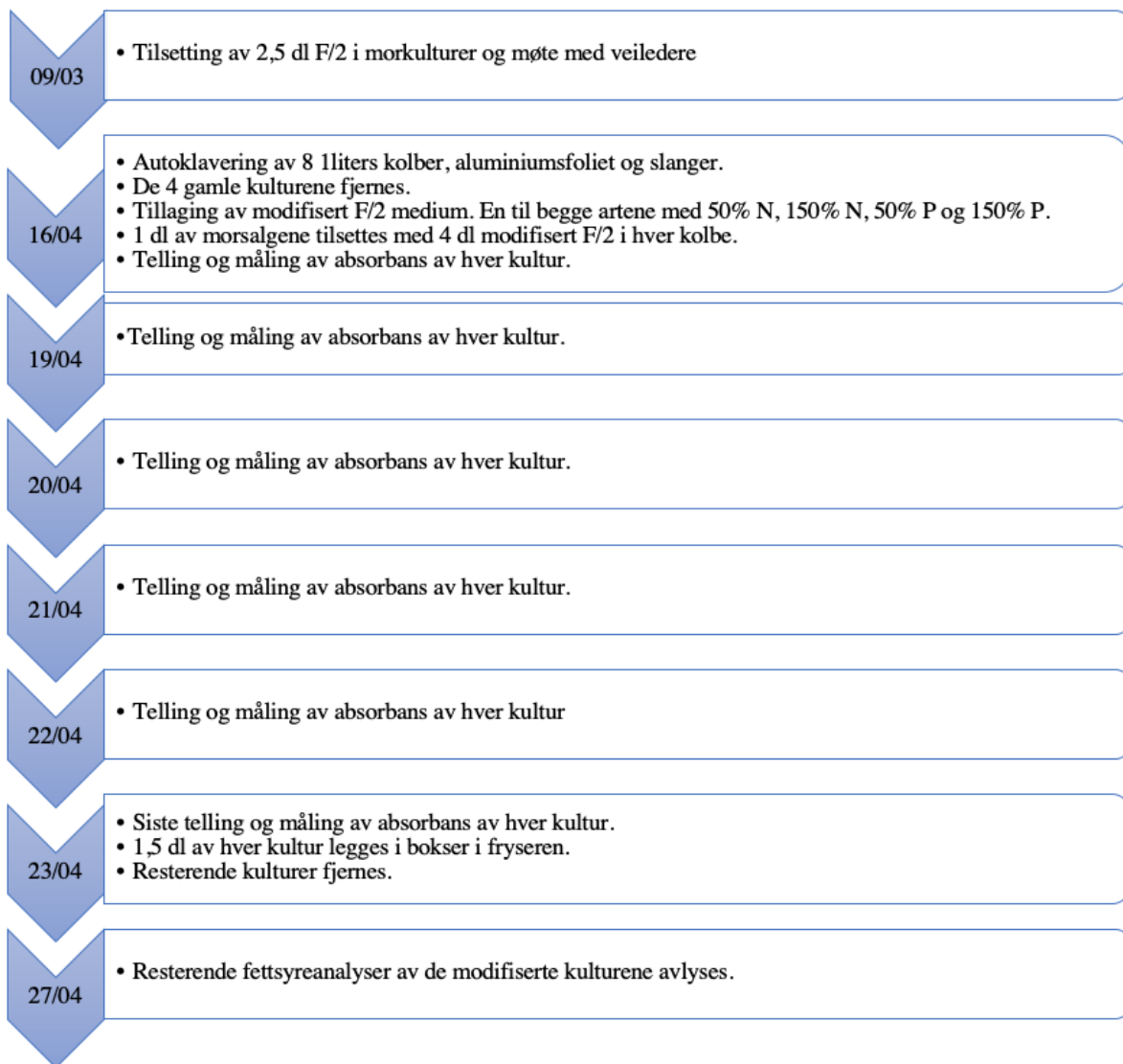
8 Vedlegg

Vedlegg 1. Tabell med oversikt over produksjonskostnader for dyrkingsmetodene åpen dam (raceway), flatpanel- og tubulære fotobioreaktorer til produksjon av biodrivstoff. Tall oppgitt i euro og eurocents/kg tørrvekt, per hektar og 100 hektar produksjonsareal, respektivt (Norsker et al. 2011, 24).

| (Base case) | Raceway ponds | | Tubulars | | Flat panels | |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|---------------|
| | cts kg ⁻¹ DW | | cts kg ⁻¹ DW | | cts kg ⁻¹ DW | |
| | 1 ha | 100 ha | 1 ha | 100 ha | 1 ha | 100 ha |
| <i>Major equipment + power</i> | | | | | | |
| PVC liner | 49.33 | 40.45 | | | | |
| Centrifuge | <u>118.66</u> | <u>44.45</u> | 43.26 | 9.54 | 38.61 | 7.23 |
| Power | <u>17.02</u> | <u>19.12</u> | 3.65 | 3.96 | 2.54 | 2.99 |
| Medium preparation | 81.31 | 44.66 | 29.29 | 9.29 | 19.31 | 7.01 |
| Power | 3.80 | 4.20 | 0.84 | 0.81 | 0.64 | 0.61 |
| Harvest buffer tank | 25.11 | 18.84 | 6.28 | 3.89 | 4.09 | 2.94 |
| Culture circulation pump | | | <u>73.74</u> | <u>73.33</u> | | |
| Power | | | <u>47.06</u> | <u>47.06</u> | | |
| Steel framework | | | | | 11.73 | 11.73 |
| Blower/paddle wheel | 4.52 | 4.53 | 6.91 | 0.99 | <u>73.55</u> | <u>69.30</u> |
| Power | 3.17 | 3.18 | 5.83 | 5.79 | <u>240.67</u> | <u>240.67</u> |
| <i>Other capital</i> | | | | | | |
| Installation costs | 41.84 | 22.94 | 47.84 | 29.11 | 44.19 | 29.46 |
| Instrumentation costs | 27.89 | 15.29 | 15.95 | 9.70 | 14.73 | 9.82 |
| Piping | 83.68 | 45.88 | 47.84 | 29.11 | 44.19 | 29.46 |
| Buildings | 83.68 | 45.88 | 47.84 | 29.11 | 44.19 | 29.46 |
| <i>Variable costs (ex. power)</i> | | | | | | |
| Polyethylene tubing/sheet | | | 12.76 | 12.76 | 9.76 | 9.76 |
| Culture medium | 44.00 | 44.00 | 44.00 | 44.00 | 44.00 | 44.00 |
| Carbon dioxide | 33.67 | 33.67 | 33.67 | 33.67 | 33.67 | 33.67 |
| Medium filters | 44.42 | 44.42 | 18.39 | 18.39 | 13.88 | 13.88 |
| Labour | 579.55 | 12.56 | 289.78 | 6.28 | 188.58 | 4.09 |
| Salary overhead | 144.89 | 3.14 | 72.44 | 1.57 | 47.15 | 1.02 |
| Maintenance | 42.91 | 23.53 | 49.07 | 29.86 | 45.32 | 30.22 |
| General plant overheads | 342.35 | 19.85 | 93.39 | 17.09 | 128.65 | 18.87 |
| Sum | 1772 | 495 | 990 | 415 | 1049 | 596 |

Vedlegg 2. Total tidslinje for praktisk arbeid.

| | |
|------------|--|
| 22/01 | <ul style="list-style-type: none"> • Møte med veiledere. |
| 04/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Forberedelser til dyrking med autoklaving og tillaging av stamløsninger til F/2-medium. |
| 11/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Flere forberedelser med filtering av sjøvann og autoklaving av 250 ml erlend meyerkolber, slanger og aluminiumsfoliet. • Algene tilsettes fordelt på to kolber per art, med 150 ml per kolbe. • Måling av lux. |
| 15/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Tilsettes 100 ml F/2. • Telling og absorpsjonsmåling av en kultur av hver art. |
| 19/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Kulturene fylles opp til 250 ml. |
| 22/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Autoklaving av sjøvann og utstyr. • Tillaging av F/2. • Oppskallering til 1 liters kolber. |
| 25/02 | <ul style="list-style-type: none"> • Tillaging av F/2. • Oppskalering til 2 liters kolber med 1,6 liter kultur. |
| 02/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Filtrering og autoklaving av sjøvann og 8 to liters plast kolber |
| 03/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Oppskalering til fire 2 liters kolber per art. • Nytt oppsett med lysrør og rørebrett for <i>T.subcordiformis</i>-kulturene. |
| 05/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Møte med veildere. |
| 09/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Tilsetting av F/2 til 2 l. Telling og absorpsjonsmåling. |
| 12/03 | <ul style="list-style-type: none"> • 1 dl av en kultur av hver art lagt i fryser. • Tilsetting av F/2. |
| 18 & 19/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Ekstraksjon av fettsyrer og GC-test. • Autoklaving sjøvann, to 2-liters kolber og slanger. |
| 23/03 | <ul style="list-style-type: none"> • Ny morkultur av begge arter med liten tetthet i 2 liters kolber. 5 kolber per art. |



Vedlegg 3. To varme lysrør som lyskilde for *I.galbana* kulturene.



Vedlegg 4. Kaldt og varmt lysrør som lyskilde for *T.subcordiformis* kulturene.



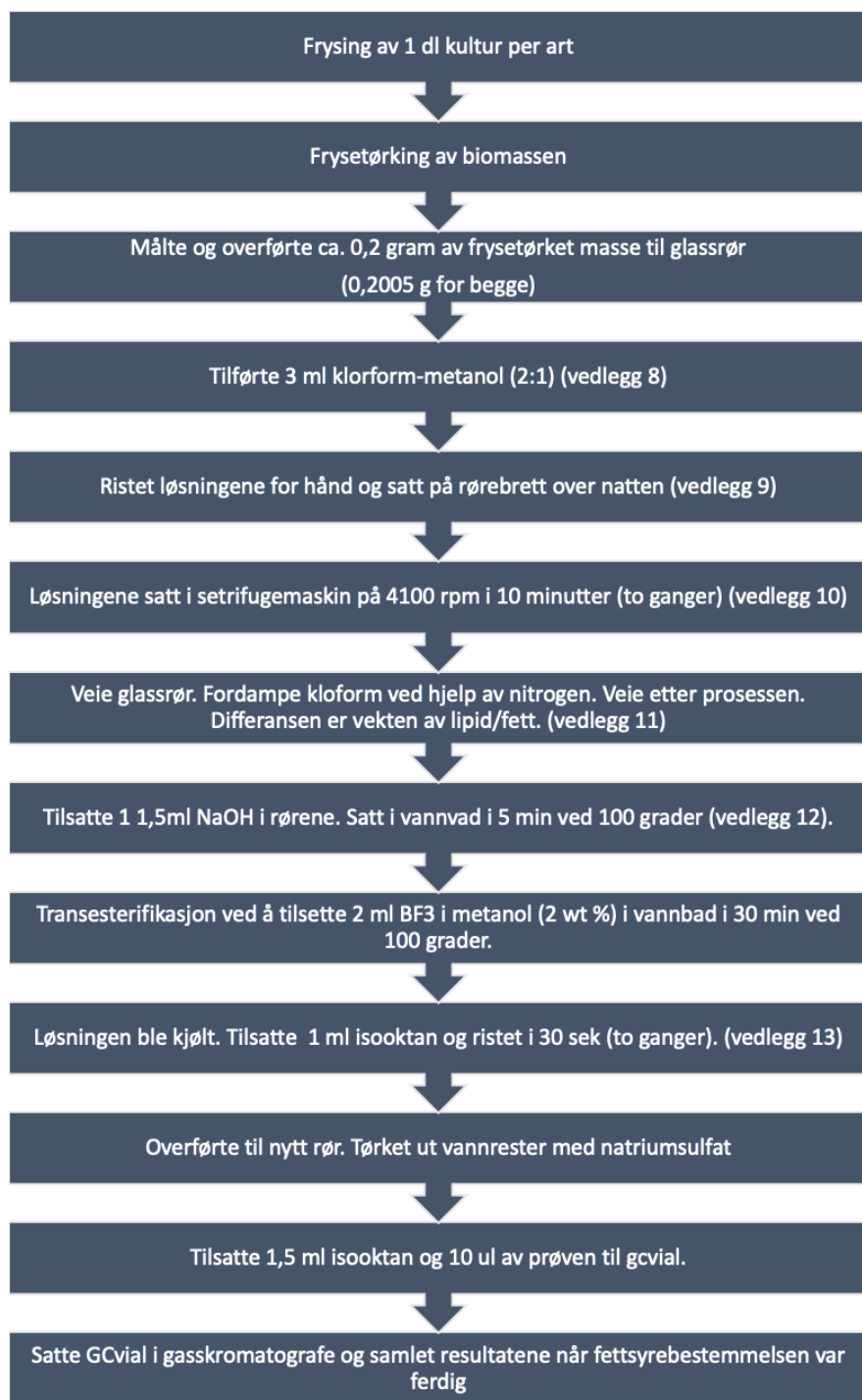
Vedlegg 5. Filtrering av sjøvann.



Vedlegg 6. De fem stamløsningene.



Vedlegg 7. Flytskjema for fettsyrebestemmelse.



Vedlegg 8. Tilsetting av kloroform-metanol.



Vedlegg 9. Prøve av *T.subcordiformis* etter et døgn med kloroform på et rørebrett.



Vedlegg 10. Prøver i sentrifugemaskin.



Vedlegg 11. Fordampet kloroform med nitrogen.



Vedlegg 12. Prøver i vannbad.



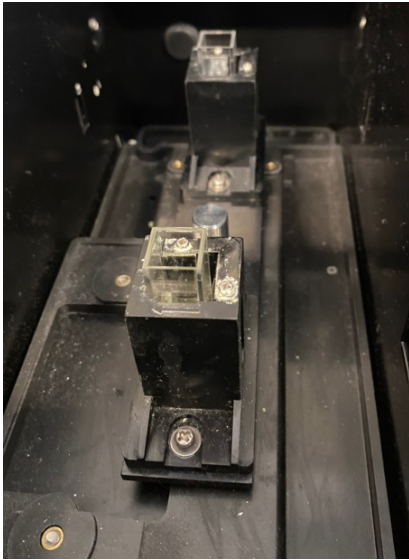
Vedlegg 13. Tilsetter isoktan før gasskromatografen.



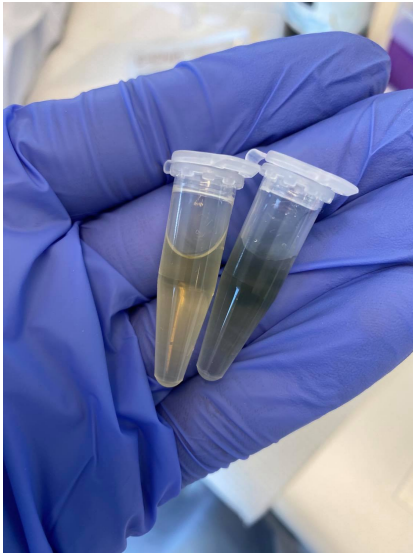
Vedlegg 14. Spektrofotometer.



Vedlegg 15. Kyvetter.



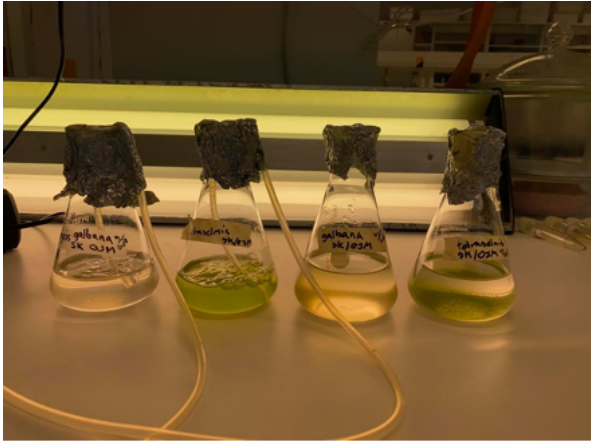
Vedlegg 16. Reaksjonstuber med begge respektive arter.



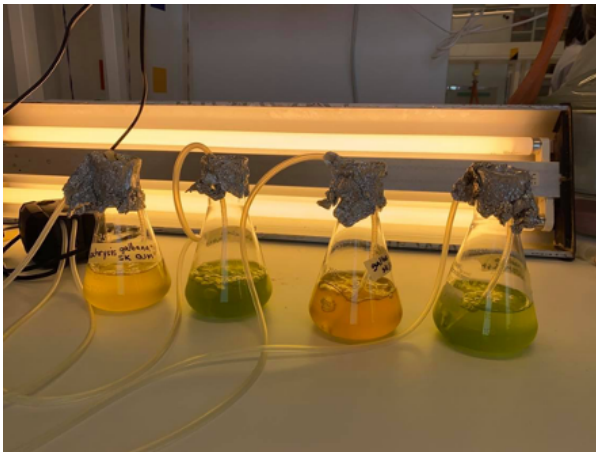
Vedlegg 17. Reaksjonstube med *T.subcordiformis* blir blandet i en "shaker".



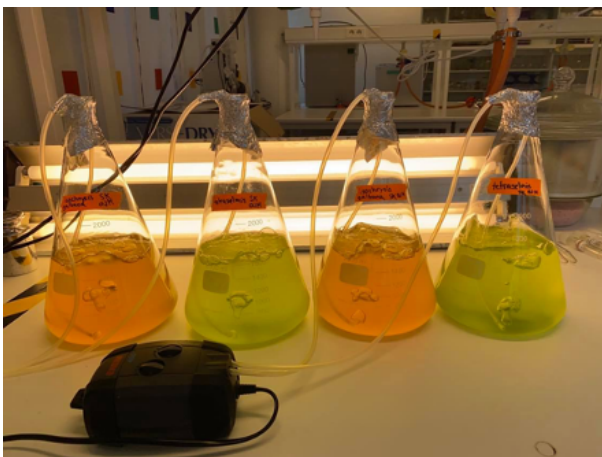
Vedlegg 18. Bilde av kulturene 15/02/21.



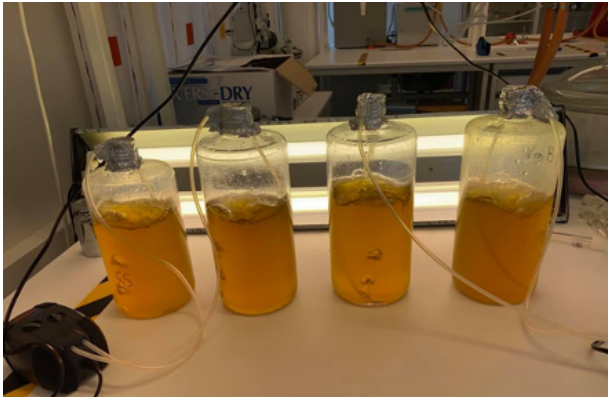
Vedlegg 19. Bilde av kulturene 19/02/21.



Vedlegg 20. Bilde av kulturene 25/02/21.



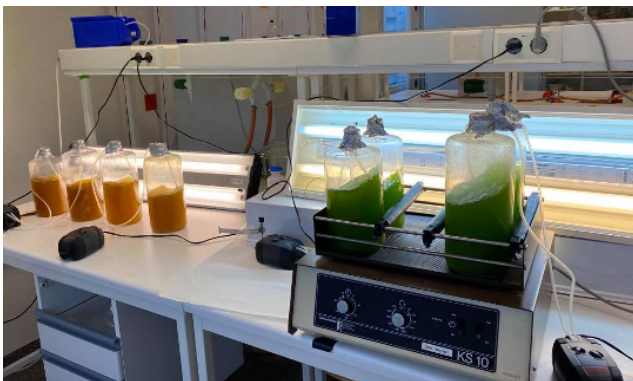
Vedlegg 21. Bilde av *I.galbana*-kulturene 03/03/21.



Vedlegg 22. Bilde av *T.subcordiformis*-kulturene 03/03/21.



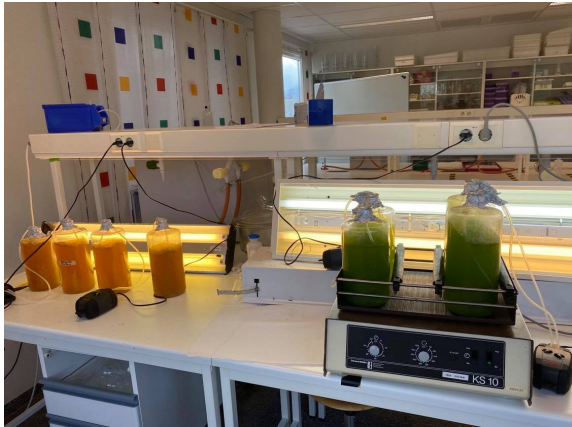
Vedlegg 23. Bilde av kulturene 09/03/21.



Vedlegg 24. Bilde av kulturene 11/03/21.



Vedlegg 25. Bilde av kulturene 11/03/21.



Vedlegg 26. Fettsyre-rapport for *T.subcordiformis*. Kolonnen med “Time min” forteller når karbonkomponenten ble registrert og “Area %” forteller hvor stor prosentandel denne var.

Page 1 of 3

| | |
|-------------------------------|--|
| Software Version : 6.3.2.0646 | Date : 3/23/2021 10:27:58 AM |
| Sample Name : Tetra3 | Data Acquisition Time : 3/21/2021 3:41:25 PM |
| Instrument Name : GC | Channel : A |
| Rack/Vial : 0/10 | Operator : tcprocess |
| Sample Amount : 1.000000 | Dilution Factor : 1.000000 |
| Cycle : 2 | |

Result File : C:\TCdata\Data\Bacheloppenger\data010-20210321-160602.rst
 Sequence File : C:\TCdata\Data\Alger_fiskeblod.seq

Fatty acids report

| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [μ V·s] |
|--------|----------------|------------|----------|-------------------|
| 1 | | 4.33 | 0.17 | 5865.66 |
| 2 | | 4.38 | 0.02 | 689.85 |
| 3 | | 4.42 | 0.06 | 1962.97 |
| 4 | | 4.48 | 0.17 | 5920.79 |
| 5 | | 4.52 | 0.10 | 3424.25 |
| 6 | | 4.57 | 0.17 | 5685.23 |
| 7 | | 4.63 | 0.69 | 23423.71 |
| 8 | C14:0 | 4.70 | 4.33 | 146673.26 |
| 9 | | 4.75 | 0.17 | 5811.45 |
| 10 | | 4.82 | 0.25 | 8449.01 |
| 11 | | 4.88 | 0.27 | 8981.52 |
| 12 | | 4.92 | 0.30 | 10034.78 |
| 13 | | 4.97 | 0.25 | 8469.77 |
| 14 | C14:1 | 5.08 | 2.18 | 74003.11 |
| 15 | | 5.18 | 0.59 | 20024.30 |
| 16 | | 5.31 | 0.10 | 3376.91 |
| 17 | | 5.36 | 0.16 | 5282.66 |
| 18 | | 5.48 | 0.16 | 5498.91 |
| 19 | | 5.53 | 0.09 | 3156.98 |
| 20 | | 5.61 | 1.86 | 63002.48 |
| 21 | | 5.67 | 0.49 | 16721.65 |
| 22 | | 5.71 | 0.27 | 9155.84 |
| 23 | | 5.75 | 0.07 | 2460.84 |
| 24 | | 5.84 | 0.03 | 1058.54 |
| 25 | | 5.93 | 0.14 | 4852.89 |
| 26 | | 6.07 | 0.02 | 674.40 |
| 27 | | 6.18 | 0.10 | 3219.98 |
| 28 | | 6.23 | 0.16 | 5470.25 |
| 29 | | 6.42 | 0.14 | 4647.31 |
| 30 | | 6.59 | 0.15 | 5153.60 |
| 31 | | 6.80 | 5.38 | 182349.36 |
| 32 | C16:0 | 7.00 | 20.71 | 701752.01 |
| 33 | | 7.23 | 1.03 | 34833.73 |
| 34 | | 7.33 | 1.92 | 64952.31 |
| 35 | | 7.41 | 2.04 | 69030.94 |
| 36 | | 7.53 | 9.51 | 322140.73 |

3/23/2021 10:27:58 AM Result:
C:\TCdata\Data\Bacheloroppgaver\data010-20210321-160602.rst

| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [μ V-s] |
|--------|----------------|------------|----------|-------------------|
| 37 | | 7.69 | 0.65 | 21977.74 |
| 38 | | 7.83 | 0.05 | 1820.61 |
| 39 | | 7.93 | 0.04 | 1217.92 |
| 40 | | 8.08 | 0.33 | 11181.60 |
| 41 | | 8.20 | 0.38 | 12782.61 |
| 42 | | 8.27 | 0.28 | 9368.12 |
| 43 | | 8.38 | 0.07 | 2428.82 |
| 44 | | 8.48 | 0.93 | 31518.16 |
| 45 | | 8.70 | 0.19 | 6444.56 |
| 46 | | 8.73 | 0.04 | 1223.38 |
| 47 | | 8.95 | 0.11 | 3564.66 |
| 48 | | 9.12 | 0.09 | 2944.97 |
| 49 | | 9.25 | 0.27 | 9242.89 |
| 50 | | 9.45 | 0.05 | 1819.12 |
| 51 | | 9.60 | 0.05 | 1676.39 |
| 52 | | 9.84 | 0.05 | 1577.83 |
| 53 | | 9.91 | 0.19 | 6479.53 |
| 54 | | 9.98 | 0.12 | 4024.26 |
| 55 | | 10.08 | 0.11 | 3663.46 |
| 56 | C18:0 | 10.22 | 12.69 | 430164.06 |
| 57 | | 10.41 | 0.04 | 1207.73 |
| 58 | C18:1n-9 | 10.50 | 4.02 | 136305.01 |
| 59 | C18:1n-7 | 10.63 | 0.90 | 30603.25 |
| 60 | | 10.80 | 0.22 | 7557.65 |
| 61 | | 10.94 | 0.08 | 2834.70 |
| 62 | | 11.17 | 0.74 | 24939.06 |
| 63 | C18:2n-6 | 11.32 | 0.55 | 18489.61 |
| 64 | | 11.42 | 0.04 | 1424.63 |
| 65 | | 11.69 | 0.15 | 5058.07 |
| 66 | | 12.04 | 0.28 | 9510.89 |
| 67 | C18:3n-3 | 12.54 | 1.39 | 46974.11 |
| 68 | | 12.68 | 0.09 | 2927.93 |
| 69 | | 13.13 | 6.35 | 215171.80 |
| 70 | | 13.58 | 0.13 | 4562.75 |
| 71 | | 13.81 | 0.39 | 13244.47 |
| 72 | C20:0 | 14.00 | 1.00 | 33716.63 |
| 73 | | 14.15 | 0.06 | 2154.64 |
| 74 | | 14.32 | 0.26 | 8788.96 |
| 75 | | 14.58 | 0.57 | 19459.10 |
| 76 | | 14.79 | 0.28 | 9513.99 |
| 77 | | 15.52 | 0.03 | 1043.58 |
| 78 | | 16.01 | 0.87 | 29499.52 |
| 79 | | 16.36 | 0.13 | 4379.83 |
| 80 | C20:3n-3 | 16.55 | 0.65 | 21923.74 |
| 81 | | 16.80 | 0.02 | 633.74 |
| 82 | | 17.33 | 0.06 | 2104.01 |
| 83 | EPA | 17.51 | 0.24 | 8272.63 |
| 84 | | 17.92 | 0.09 | 2930.71 |
| 85 | C22:0 | 18.03 | 2.87 | 97316.65 |

Page 2 of 3

3/23/2021 10:27:58 AM Result:
C:\TCdata\Data\Bacheloroppgaver\data010-20210321-160602.rst

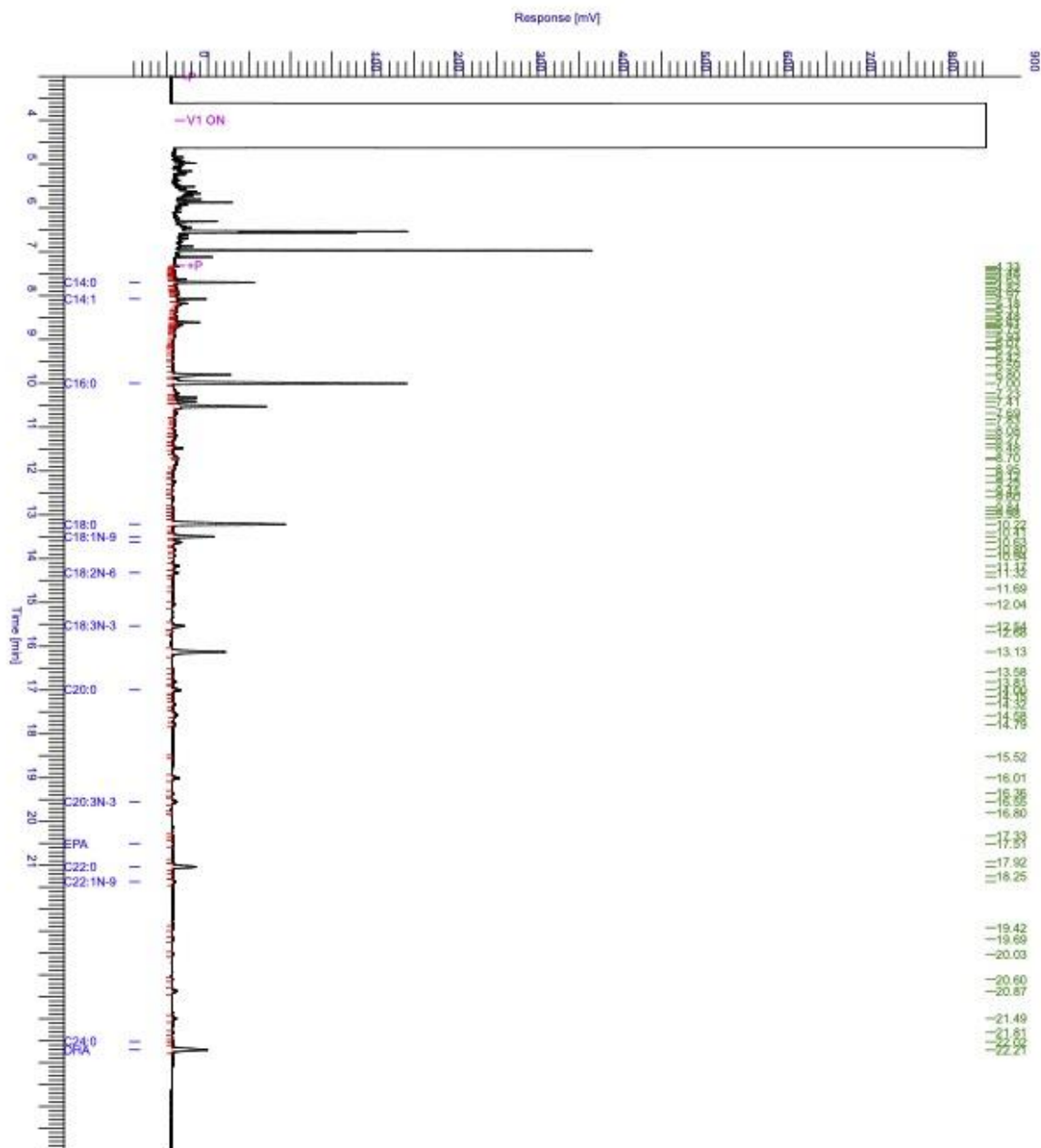
| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [μ V-s] |
|--------|----------------|------------|------------|-------------------|
| 86 | | 18.25 | 0.12 | 3925.81 |
| 87 | C22:1n-9 | 18.38 | 0.25 | 8432.00 |
| 88 | | 19.42 | 0.09 | 2904.65 |
| 89 | | 19.69 | 0.11 | 3610.07 |
| 90 | | 20.03 | 0.11 | 3819.38 |
| 91 | | 20.60 | 0.08 | 2617.78 |
| 92 | | 20.87 | 0.67 | 22828.59 |
| 93 | | 21.49 | 0.55 | 18575.63 |
| 94 | | 21.81 | 0.04 | 1450.75 |
| 95 | C24:0 | 22.02 | 0.02 | 790.27 |
| 96 | DHA | 22.21 | 4.54 | 153701.82 |
| | | 100.00 | 3388538.80 | |

Warning -- Signal level out-of-range in peak

Vedlegg 27. Kromatogram for *T.subcordiformis*. Her visualiseres retensjonstiden og responsen (mV) for karbonkomponentene som registreres.

Chromatogram

Sample Name : Tetra3 Sample #: 003 Page 1 of 1
 FileName : C:\TC\data\Data\Bacheloroppgever\data\010-20210321-154134.raw
 Date : 3/23/2021 10:28:24 AM
 Method :
 Time of Injection: 3/21/2021 3:41:25 PM
 Start Time : 0.00 min End Time : 24.50 min Low Point : -45.18 mV High Point : 993.88 mV
 Scale Factor : 1.0 Plot Offset : -45.18 mV Plot Scale: 1039.1 mV



Vedlegg 28. Fettsyre-rapport for *I.galbana*. Kolonne med “Time min” forteller når karbonkomponenten ble registrert og “Area %” forteller hvor stor prosentandel denne var.

Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : Iso3
 Instrument Name : GC
 Rack/Vial : 0/11
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 3

Date : 3/23/2021 10:43:30 AM
 Data Acquisition Time : 3/21/2021 4:11:42 PM
 Channel : A
 Operator : tcprocess
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : C:\TCdata\Data\Bacheloroppgaver\data011-20210321-163618.rst
 Sequence File : C:\TCdata\Data\Alger_fiskeblod.seq

Fatty acids report

| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$] |
|--------|----------------|------------|----------|-------------------------------------|
| 1 | | 4.35 | 0.41 | 15265.86 |
| 2 | | 4.43 | 0.10 | 3766.25 |
| 3 | | 4.49 | 0.20 | 7484.15 |
| 4 | | 4.53 | 0.08 | 2798.87 |
| 5 | | 4.58 | 0.14 | 5261.40 |
| 6 | | 4.64 | 0.63 | 23367.00 |
| 7 | C14:0 | 4.71 | 0.87 | 32248.26 |
| 8 | | 4.76 | 0.13 | 4940.34 |
| 9 | | 4.84 | 0.14 | 5243.16 |
| 10 | | 4.89 | 0.18 | 6814.35 |
| 11 | | 4.95 | 0.15 | 5714.04 |
| 12 | | 5.00 | 0.10 | 3725.36 |
| 13 | C14:1 | 5.09 | 1.90 | 70840.51 |
| 14 | | 5.19 | 0.72 | 26938.73 |
| 15 | | 5.32 | 0.08 | 3107.95 |
| 16 | | 5.37 | 0.13 | 4897.93 |
| 17 | | 5.44 | 0.01 | 450.81 |
| 18 | | 5.49 | 0.16 | 6090.87 |
| 19 | | 5.54 | 0.32 | 11971.42 |
| 20 | | 5.62 | 1.69 | 62802.67 |
| 21 | | 5.68 | 0.18 | 6626.69 |
| 22 | | 5.72 | 0.23 | 8615.70 |
| 23 | | 5.76 | 0.16 | 5845.11 |
| 24 | | 5.85 | 0.02 | 663.22 |
| 25 | | 5.90 | 0.13 | 4906.88 |
| 26 | | 5.94 | 0.10 | 3832.54 |
| 27 | | 6.01 | 0.14 | 5153.71 |
| 28 | | 6.20 | 0.06 | 2135.42 |
| 29 | | 6.31 | 0.13 | 4995.57 |
| 30 | | 6.44 | 0.21 | 7943.12 |
| 31 | | 6.53 | 0.08 | 3003.35 |
| 32 | | 6.61 | 0.07 | 2480.35 |
| 33 | | 6.81 | 6.95 | 258737.45 |
| 34 | C16:0 | 7.02 | 22.26 | 828593.70 |
| 35 | | 7.10 | 0.01 | 294.53 |
| 36 | | 7.19 | 0.10 | 3633.54 |

3/23/2021 10:43:30 AM Result:
 C:\TCdata\Data\Bacheloroppgaver\data011-20210321-163618.rst

| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$] |
|--------|----------------|------------|----------|-------------------------------------|
| 37 | | 7.24 | 2.13 | 79244.98 |
| 38 | | 7.34 | 0.29 | 10867.48 |
| 39 | | 7.42 | 0.16 | 5934.61 |
| 40 | | 7.54 | 8.07 | 300496.18 |
| 41 | | 7.69 | 0.44 | 16244.33 |
| 42 | | 7.74 | 0.23 | 8633.10 |
| 43 | | 7.89 | 0.45 | 16670.49 |
| 44 | | 7.98 | 0.09 | 3251.85 |
| 45 | | 8.11 | 0.16 | 6034.35 |
| 46 | | 8.28 | 0.14 | 5243.23 |
| 47 | | 8.33 | 0.53 | 19712.16 |
| 48 | | 8.49 | 0.84 | 31088.80 |
| 49 | | 8.72 | 0.21 | 7790.84 |
| 50 | | 8.77 | 0.17 | 6208.40 |
| 51 | | 8.89 | 0.21 | 7855.62 |
| 52 | | 8.96 | 0.05 | 1819.77 |
| 53 | | 9.12 | 0.04 | 1387.09 |
| 54 | | 9.27 | 0.16 | 6026.00 |
| 55 | | 9.39 | 2.32 | 86200.41 |
| 56 | | 9.60 | 0.07 | 2491.67 |
| 57 | | 9.92 | 0.10 | 3879.17 |
| 58 | | 10.09 | 0.07 | 2602.36 |
| 59 | C18:0 | 10.23 | 11.53 | 428917.93 |
| 60 | | 10.31 | 0.01 | 449.46 |
| 61 | C18:1n-9 | 10.53 | 8.49 | 315955.93 |
| 62 | C18:1n-7 | 10.64 | 1.41 | 52371.39 |
| 63 | | 10.81 | 0.24 | 9053.07 |
| 64 | | 10.95 | 0.03 | 1088.62 |
| 65 | | 11.19 | 5.92 | 220287.85 |
| 66 | C18:2n-6 | 11.34 | 1.86 | 69095.90 |
| 67 | | 11.69 | 0.09 | 3438.61 |
| 68 | | 11.81 | 0.31 | 11369.01 |
| 69 | | 11.89 | 0.17 | 6318.95 |
| 70 | | 12.06 | 0.28 | 10353.10 |
| 71 | C18:3n-3 | 12.55 | 3.11 | 115892.24 |
| 72 | | 12.70 | 0.11 | 3922.58 |
| 73 | | 13.13 | 1.13 | 42218.37 |
| 74 | | 13.59 | 0.06 | 2176.59 |
| 75 | | 13.82 | 0.29 | 10800.09 |
| 76 | C20:0 | 14.01 | 0.94 | 34815.10 |
| 77 | | 14.25 | 0.06 | 2141.70 |
| 78 | | 14.33 | 0.72 | 26691.37 |
| 79 | | 14.58 | 0.59 | 22093.96 |
| 80 | | 14.80 | 0.21 | 7783.67 |
| 81 | | 16.01 | 0.83 | 30815.48 |
| 82 | C20:4n-6 | 16.20 | 0.24 | 8964.86 |
| 83 | | 16.36 | 0.11 | 4209.79 |
| 84 | C20:3n-3 | 16.57 | 0.19 | 6922.51 |
| 85 | | 17.09 | 0.07 | 2581.42 |

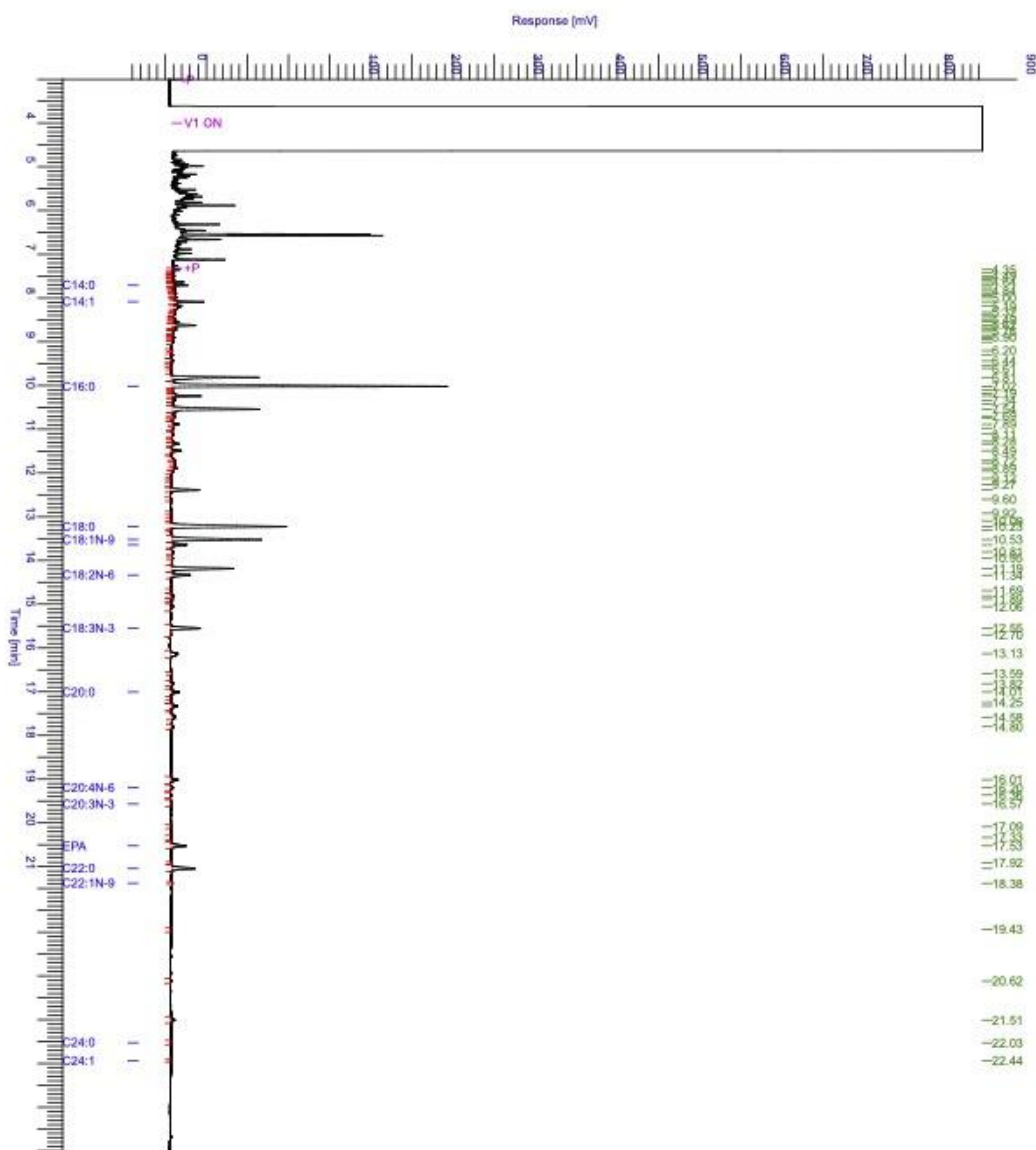
3/23/2021 10:43:30 AM Result:
C:\TCdata\Data\Bacheloppgaver\data011-20210321-163618.rst

| Peak # | Component Name | Time [min] | Area [%] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$] |
|--------|----------------|------------|----------|-------------------------------------|
| 86 | | 17.33 | 0.06 | 2286.74 |
| 87 | EPA | 17.53 | 1.66 | 61939.60 |
| 88 | | 17.92 | 0.05 | 1733.40 |
| 89 | C22:0 | 18.04 | 2.62 | 97453.67 |
| 90 | C22:1n-9 | 18.38 | 0.02 | 737.61 |
| 91 | | 19.43 | 0.06 | 2101.33 |
| 92 | | 20.62 | 0.07 | 2756.80 |
| 93 | | 21.51 | 0.48 | 17884.22 |
| 94 | C24:0 | 22.03 | 0.07 | 2522.27 |
| 95 | C24:1 | 22.44 | 0.01 | 497.81 |
| | | | 100.00 | 3721516.70 |

Vedlegg 29. Kromatogram for *I.galbana*. Her visualiseres retensjonstiden og responsen (mV) for karbonkomponentene som registreres.

Chromatogram

Sample Name : Iso3 Sample #: 003 Page 1 of 1
 FileName : C:\TCD\data\Bachelorsoppgaver\data\011-20210321-161158.raw
 Date : 3/23/2021 10:43:59 AM
 Method : Time of Injection: 3/21/2021 4:11:42 PM
 Start Time : 0.00 min End Time : 24.50 min Low Point : -45.20 mV High Point : 993.88 mV
 Scale Factor : 1.0 Plot Offset: -45.20 mV Plot Scale: 1039.1 mV



Vedlegg 30. Tetthet (celler/ml) i *T.subcordiformis*-kulturene med ulike næringsverdier over 8 dager (dag 2 og 3 var en lørdag og søndag).

| Dag | 50% N | 150% N | 50% P | 150% P |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 160000 | 170000 | 210000 | 150000 |
| 4 | 495000 | 985000 | 620000 | 605000 |
| 5 | 1000000 | 1225000 | 950000 | 1090000 |
| 6 | 1070000 | 1330000 | 1010000 | 1200000 |
| 7 | 1300000 | 1385000 | 1150000 | 1510000 |

| | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|
| 8 | 1340000 | 1720000 | 1375000 | 1935000 |
|---|---------|---------|---------|---------|

Vedlegg 31. Absorbans i *T.subcordiformis*-kulturene med ulike næringsverdier over 8 dager (dag 2 og 3 var en lørdag og søndag).

| Dag | 50% N | 150% N | 50% P | 150% P |
|-----|-------|--------|-------|--------|
| 1 | 0,124 | 0,149 | 0,185 | 0,171 |
| 4 | 0,4 | 0,457 | 0,352 | 0,36 |
| 5 | 0,455 | 0,57 | 0,47 | 0,563 |
| 6 | 0,546 | 0,64 | 0,555 | 0,635 |
| 7 | 0,56 | 0,703 | 0,587 | 0,777 |
| 8 | 0,635 | 0,87 | 0,741 | 1,068 |

Vedlegg 32. Tetthet (celler/ml) i *I.galbana*-kulturene med ulike næringsverdier over 8 dager (dag 2 og 3 var en lørdag og søndag).

| Dag | 50% N | 150% N | 50% P | 150% P |
|-----|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 2360000 | 2040000 | 2440000 | 2520000 |
| 4 | 7110000 | 9405000 | 6660000 | 8145000 |
| 5 | 8370000 | 13140000 | 9900000 | 12330000 |
| 6 | 8775000 | 15840000 | 12780000 | 15525000 |
| 7 | 11565000 | 20340000 | 17685000 | 17370000 |
| 8 | 14800000 | 24840000 | 18270000 | 18675000 |

Vedlegg 33. Absorbans i *I.galbana*-kulturene med ulike næringsverdier over 8 dager (dag 2 og 3 var en lørdag og søndag).

| Dag | 50% N | 150% N | 50% P | 150% P |
|-----|-------|--------|-------|--------|
| 1 | 0,442 | 0,448 | 0,572 | 0,42 |
| 4 | 0,938 | 1,101 | 1,082 | 1,027 |
| 5 | 1,001 | 1,166 | 1,166 | 1,145 |
| 6 | 1,088 | 1,403 | 1,24 | 1,208 |
| 7 | 1,184 | 1,479 | 1,326 | 1,302 |
| 8 | 1,265 | 1,583 | 1,385 | 1,393 |

