

**Effekt av miksotrof vekst på biomasse- og
lipidproduksjon hos *Phaeodactylum tricornutum*
og *Isochrysis galbana*
en bioteknologisk tilnærming**

Benedikte Pedersen Frøysa

Masteroppgave i mikrobiologi
Institutt for biovitenskap

Vår 2020



UNIVERSITETET I BERGEN
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|---------------|
| Sammendrag | - 3 - |
| Forord | - 5 - |
| Forkortelser | - 6 - |
| | 6 |
| 1 Introduksjon | - 7 - |
| <i>Mål for denne masteroppgaven</i> | - 8 - |
| 2 Bakgrunn | - 10 - |
| 2.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | - 10 - |
| 2.2 <i>Isochrysis galbana</i> | - 11 - |
| 2.3 <i>Industriell produksjon av mikroalger</i> | - 12 - |
| 2.3.1 <i>Muligheter</i> | - 12 - |
| 2.3.2 <i>Utfordringer</i> | - 14 - |
| 2.4 <i>Sentral karbonmetabolisme i mikroalger</i> | - 15 - |
| 2.5 <i>Lipider i mikroalger</i> | - 16 - |
| 2.6 <i>Dyrkingsmetoder</i> | - 17 - |
| 3 Materialer og metoder | - 19 - |
| 3.1 <i>Mikroalger og karbonsubstrater</i> | - 20 - |
| 3.1.1 <i>Mikroalger</i> | - 20 - |
| 3.1.2 <i>Vekstmedium og organiske karbonsubstrater</i> | - 21 - |
| 3.2 <i>Vekstforsøk</i> | - 21 - |
| 3.2.1 <i>Batch-kulturer</i> | - 21 - |
| 3.2.2 <i>Kontinuerlige kulturer</i> | - 22 - |
| 3.3 <i>Analysar</i> | - 23 - |
| 3.3.1 <i>Spektrofotometri</i> | - 23 - |
| 3.3.2 <i>Celletelling</i> | - 24 - |
| 3.3.3 <i>Flowcytometri (FCM)</i> | - 24 - |
| 3.3.4 <i>Elementanalyse (CHN)</i> | - 25 - |
| 3.3.5 <i>Analyse av acetatkonsentrasjon i medium av kontinuerlige kulturer</i> | - 25 - |
| 3.3.6 <i>Utregninger</i> | - 26 - |
| 4 Resultater | - 28 - |
| 4.1 <i>Batch-forsøk</i> | - 28 - |
| 4.1.1 <i>Vekst på organiske karbonsubstrater</i> | - 28 - |
| 4.1.2 <i>Effekt av organiske karbonsubstrater på totalt lipidinnhold og fettsyreprofil</i> | - 31 - |
| 4.1.3 <i>Effekt av organiske karbonsubstrater på lipidproduktivitet</i> | - 32 - |
| 4.1.4 <i>Bakterieinnhold</i> | - 37 - |
| 4.1.5 <i>Karbon/Nitrogen-forhold</i> | - 39 - |
| 4.2 <i>Kontinuerlig kultur</i> | - 41 - |
| 4.2.1 <i>Vekst i kontinuerlige kulturer</i> | - 41 - |
| 4.2.2 <i>Fettsyreinnhold i kontinuerlige kulturer</i> | - 43 - |
| 4.2.3 <i>Bakterieinnhold i kontinuerlige kulturer</i> | - 47 - |

| | |
|--|---------------|
| 4.2.4 Karbon/nitrogen-forhold i kontinuerlige kulturer | - 48 - |
| 4.2.5 Morfologi | - 49 - |
| 5 Diskusjon | - 50 - |
| 5.1 Batch-forsøk | - 50 - |
| 5.1.1 Effekt av organiske karbonsubstrater på vekst og fettsyreinnhold av <i>P. tricornutum</i> | - 51 - |
| 5.1.2. Effekt av organiske karbonsubstrater på vekst og fettsyreinnhold av <i>Isochrysis galbana</i> | - 54 - |
| 5.1.3 Karbon og Nitrogen innhold | - 55 - |
| 5.1.4 Valg av alge og karbonsubstrat til forsøk i turbidostat-reaktor | - 56 - |
| 5.2 Kontinuerlig kultur..... | - 57 - |
| 5.2.1 Effekt av acetat ved dyrking med lys/mørke-syklus | - 57 - |
| 5.2.2 Effekt av lys/mørkesyklus ved dyrking med acetat | - 58 - |
| 5.3 Diskusjon rundt metoder | - 60 - |
| 5.3.1 Batch-kulturer | - 60 - |
| 5.3.2. Kontinuerlig kultur | - 61 - |
| Konklusjon..... | - 62 - |
| Videre arbeid..... | - 63 - |
| Referanser..... | - 65 - |
| Vedlegg A: Batch..... | - 76 - |
| A.1: Logaritmiske vekstkurver basert på optisk tetthet | - 76 - |
| A.2: Vekstkurver basert på celledelling i mikroskop | - 77 - |
| A.3: Karbon og Nitrogen-innhold..... | - 78 - |
| Vedlegg B: Resultat kontinuerlig kultur..... | - 79 - |
| B.1: Celleantall og fordeling i steady state..... | - 79 - |
| B.3: Loggførte kultiveringsparametere gjennom steady state | - 80 - |
| B.4: Acetatinnhold..... | - 82 - |
| Vedlegg C: Medium og løsninger | - 83 - |
| Tabell C.1. f/4 medium i 100 % sjøvann..... | - 83 - |
| Tabell C.2. Walnes medium i 1L 100% sjøvann | - 83 - |
| Tabell C.3. Stamløsninger og tilsetningsmengde av karbonsubstrater til batch- kulturer | - 84 - |
| av <i>P. tricornutum</i> | - 84 - |
| Tabell C.4. Stamløsninger og tilsetningsmengde av karbonsubstrater til batch- kulturer | - 84 - |
| av <i>I. galbana</i> | - 84 - |
| Tabell C.5. Stamløsning og tilsetningsmengde av acetat til kontinuerlige kulturer..... | - 84 - |
| av <i>P. tricornutum</i> | - 84 - |

Sammendrag

Mikroalger utgjør en mangfoldig gruppe av arter med stor metabolsk diversitet. Disse artene kan produsere en rekke kommersielt interessante produkter som kan brukes i human næringsmiddelindustri, helsekost, legemiddelindustri og dyrefôr, for å nevne noen. Dette har ført til økende interesse for utnyttelse av mikroalger i industriell sammenheng, og følgelig også interesse for optimalisering av dyrkings- og prosesssteknologiske metoder for å maksimere utbytte. De fleste mikroalger er fotoautotrofe og bruker energi fra lys til å omdanne uorganisk karbon (CO₂) til organisk materiale, men en rekke arter kan også utnytte organiske karbonsubstrater til vekst, og for mange vil en slik mikсотrof metabolsk strategi føre til økt veksthastighet og et mer gunstig og/eller høyere innhold av lipider.

I dette prosjektet undersøkte jeg vekst og lipidsammensetning hos de to mikroalgeartene *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis galbana* og deres respons på tilsetning av glukose, glyserol og acetat som organiske karbonsubstrater til vekstmediene. Kartlegging av mikroalgenes innhold av flerumettede fettsyrer, særlig omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) stod sentralt. Det er vel kjent at omega-3 fettsyrer har flere helsefordeler for både dyr og mennesker, og etterspørselen er voksende. Hovedtyngden av omega-3 på markedet produseres i dag fra fisk, men fordi flere fiskebestander er sårbare som følge av klimaendringer og overfiske utgjør mikroalger en høyst aktuell alternativ kilde til de høyverdige fettsyrene.

Prosjektet hadde to hoveddeler. Del I innebar dyrkingsforsøk av de to artene som batch-kulturer med og uten de organiske karbonkildene, alt under 24 timers belysning. For *I. galbana* førte glukosetilsetning til høyest produktivitet av både biomasse og fettsyrer generelt. Acetat var det eneste organiske karbonsubstratet som resulterte i like høy biomasseproduktivitet som fotoautotrof dyrking for *P. tricornutum*, og samtidig høyere produktivitet av PUFA, herunder også EPA. På bakgrunn av disse resultatene ble *P. tricornutum* og acetat valgt som henholdsvis alge og organisk karbonsubstrat til følgende forsøk i turbidostat-reaktor som del II av prosjektet: 18:6 L/M (Lys/Mørke) med og uten acetat og 24:0 L/M med acetat for å undersøke effekten av mørkeperiode og acetatstilsetning på vekst og fettsyreinhold. Kulturen dyrket med lys/mørke-syklus uten tilsetning av acetat hadde lavere fettsyreinhold enn kulturene tilsatt acetat, men signifikant høyere produktivitet og derfor et større utbytte av EPA og andre flerumettede fettsyrer. På grunn av høyere grad av

kontaminasjon i reaktor gjennom de to andre forsøkene var det likevel ikke mulig å si med sikkerhet at lys/mørke-syklus uten tilsetning av acetat er en bedre strategi enn 18:6 med acetat eller 24:0 med acetat for dyrking av *P. tricornutum* som kontinuerlig kultur.

Forord

Jeg har hatt to utrolig fine år ved universitetet i Bergen. Jeg vil takke hele avdelingen for marin mikrobiologi, som alle er med og bidrar til et inkluderende og varmt miljø.

Jeg ønsker å anerkjenne det treårige "MIXsTRUCKT" prosjektet, finansiert av Norges Forskningsråd (prosjekt nr.280414), som denne oppgaven er en del av.

Tusen takk til mine veiledere: Aud Larsen, Dorinde Kleinegris og Kyle Mayers for oppfølging og hjelp underveis. En stor takk til Hanna Böpple som har satt meg inn i praktiske oppgaver og som alltid har stilt opp og kommet med konstruktive tilbakemeldinger underveis. Pia Steinrücken har vært svært hjelpsom gjennom arbeidet med turbidostat-reaktoren og takket være henne ble feilen i etablert metode for tørrvektsmålinger oppdaget. Sist, men ikke minst, vil jeg takke familie og venner for støtte og oppmuntrende ord underveis og mine to firbeinte venner som har bidratt til å senke stressnivået betydelig.

Forkortelser

BM – Biomasse

C:N - Carbon:Nitrogen (Forhold mellom karbon og nitrogen)

DHA - Dokosaheksaensyre (22:6n-3)

EPA - Eikosapentaensyre (20:5n-3)

FA - Fatty Acid (Fettsyre)

FAME - Fatty Acid Methyl Ester (Fettsyre metyl ester)

FCM - Flow Cytometri

GC - Gas Chromatography (Gasskromatografi)

L/M - Lys:Mørke

OD - Optic Density (Optisk tetthet)

PCA – Prinsipialkomponentanalyse

rpm - rounds per minute (omdreininger i minuttet)

18:6 L/M -18 timer lys/6 timer mørke

14:0 – Myristinsyre

16:0 – Palmitinsyre

16:1 n-7 – Palmitolensyre

16:2 n-4 – Heksadekadiensyre

16:3 n-4 – Heksadekatriensyre

18:1 n-9 – Oljesyre

18:3 n-3 – Alfalinolensyre

20:4 n-6 – Arakidonsyre

20:5 n-3 – Eikosapentaensyre

24:1 n-9 – Nervonsyre

22:6 n-3 - Dokosaheksaensyre

1 Introduksjon

Mikroalger er en stor og svært mangfoldig gruppe av encellede, fotosyntetiske protister som utgjør grunnlaget i næringskjeden i havet og står rundt 50% av karbonfikseringen på kloden (Falkowski, 1994). Det er anslått at det finnes mellom 200 000 til 800 000 arter, hvorav omlag 50 000 av disse per i dag er beskrevet (Suganya et al., 2016). Innen fykologi (læren om alger) blir enhver organisme med klorofyll a med plantelegeme som ikke danner rot definert som alge (Lee, 2008). Fordi også fotosyntetiske bakterier går under denne betegnelsen blir det i anvendt fykologi gjort et skille mellom mikroskopiske alger (mikroalger) og fotosyntetiske bakterier (cyanobakterier), selv om cyanobakterier i mye av litteraturen også omtales som mikroalger.

I flere tusen år har fytoplankton, bl.a. *Arthrospira platensis*, kjent som *Spirulina*, blitt brukt som næringskilder for mennesker (Jensen, 2001; Spolaore et al., 2006). Interessen for bioteknologisk utnyttelse av disse organismene skjøt imidlertid ikke fart før på midten av 1900-tallet, da det ble oppdaget at diatomeer akkumulerte fettsyrer ved nitrogenunderskudd (Chen, 1996; Harder & von Witsch, 1942). Siden den gang har mikroalger fått økt oppmerksomhet i takt med behovet for å dekke den globale etterspørselen etter både mat, drivstoff, farmasøytiske produkter og bærekraftige løsninger som kan supplere eller i beste fall erstatte eksisterende produkter og produksjonsmetoder. De mange mikroalgene har høy grad av genetisk og metabolsk diversitet, noe som gjør det mulig å benytte dem til produksjon av en rekke høyverdige biokjemiske produkter av kommersiell interesse, deriblant proteiner, vitaminer, pigmenter og fettsyrer (Borowitzka, 2010; Brown et al., 1999; Chisti, 2007). Mikroalger kan produseres kommersielt for en rekke formål, fra fôr til biodrivstoff, kosttilskudd, kosmetikk, farmasøytiske ingredienser m.m. (Chu, 2012). Mikroalger har en langt høyere produktivitet enn terrestrielle planter og produserer en stor mengde lipider, alt fra 20-50 % av tørrvekt, mens enkelte kan oppnå en fraksjon på over 80% (Chisti, 2007).

Kun et fåtall fytoplankton blir i dag dyrket i storskala. Blant de mest sentrale er cyanobakterien *Arthrospira platensis* og mikroalgene *Dunaliella salina* og *Chlorella vulgaris* (Fu et al., 2013; Sathasivam et al., 2019). Den vanligste produksjonsformen for algedyrking er fotoautotrof kultivering, hvor algen fikserer uorganisk karbon (primært karbondioksid) til organisk materiale med energi fra sollys (Cheirsilp & Torpee, 2012). Noen mikroalger kan vokse heterotroft, som vil si at både karbon og energi kommer fra organiske molekyler (Liu et

al., 2014). Miksotrofi er definert som evne til å kombinere fototrofi og heterotrofi. En slik kombinasjon kan foregå ved bruk av lys som energikilde til samtidig assimilering av både CO₂ og organisk karbon til å drive fotosyntese og respirasjon på samme tid, eller ved å skifte mellom prosessene ut fra endringer i miljøforhold som lys og næringstilgang (JONES, 1997). Flere arter har ved miksotrof kultivering vist seg å vokse raskere og akkumulere en høyere andel fettsyrer enn ved fotoautotrof vekst, noe som har ført til en økt interesse for miksotrofi som strategi for industriell utnyttelse (Chen, 1996; Garcia et al., 2005; Park et al., 2014). Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* og haptofyitten *Isochrysis galbana* er to alger som har vært mye benyttet som næringsmiddel til akvakultur (Spolaore et al., 2006). De kan begge vokse miksotroft og flere studier peker på at en slik kultivering medfører raskere vekst og økt lipidinnhold (Alkhamis & Qin, 2013; Garcia et al., 2005). *P. tricornutum* produserer en høy mengde av omega-3 fettsyren EPA, mens *I. galbana* er rik på omega-3 fettsyren DHA, noe som gjør det interessant å studere hvilken respons de har til ulike organiske karbonsubstrater da de begge er aktuelle kandidater for kommersiell produksjon av omega-3 og andre flerumettede fettsyrer.

Mål for denne masteroppgaven

Målet for denne masteroppgaven var å undersøke vekst og fettsyresammensetning av de to mikroalgeartene *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis galbana* ved dyrking med tre forskjellige organiske karbonsubstrater: glukose, glyserol, acetat og vurdere potensialet for utnyttelse av miksotrofi i kommersiell produksjon, med fokus på omega-3 fettsyrene EPA og DHA.

Følgende spørsmål ble stilt i forkant av forsøkene:

Del I: Batch-kultur (dyrking med begrenset mengde næringsmidler uten næringstilsetning underveis)

- Er det en signifikant forskjell i biomasse-produktivitet, fettsyreinnhold og fettsyresammensetning hos de to algene ved dyrking med tilskudd av organiske karbonsubstrater sammenlignet med fotoautotrof dyrking?
- Hvilket organisk karbonsubstrat stimulerer i størst grad til vekst og lipid-akkumulering?

Del II: Kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor med lys/mørke-syklus (dyrking med automatisk tilførsel av medium i lys-periode regulert etter tetthet i kultur)

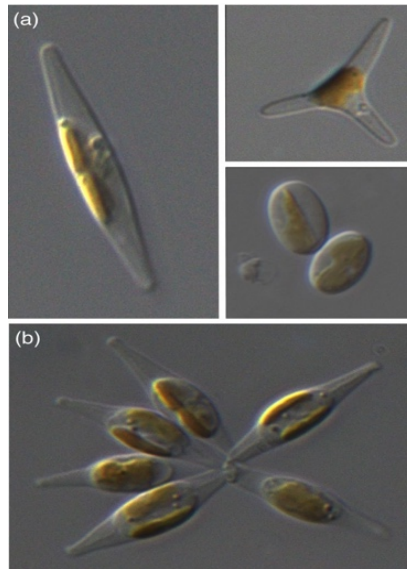
- Vil lys/mørke-syklus føre til signifikante forskjeller i biomasseproduktivitet, fettsyreinnhold og fettsyresammensetning mellom kulturer dyrket med og uten acetat?
- Vil det være signifikante forskjeller mellom kultur med konstant belysning og kultur med lys/mørke-syklus ved dyrking med acetat?

For å besvare disse spørsmålene ble det utført et batch-eksperiment hvor begge alger ble dyrket med og uten glukose, glyserol og acetat. *P. tricornutum* og acetat som det organiske karbonsubstratet ble valgt til forsøk i kontinuerlig kultur. I begge forsøk ble biomasseproduktivitet, lipidinnhold og lipidproduktivitet kartlagt. Elementkomposisjon (karbon og nitrogen) og bakterieinnhold ble også målt i de ulike kulturene for å bidra til å forklare forskjeller observert i produktivitet og lipidinnhold.

2 Bakgrunn

2.1 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum (klasse: Bacillariophyceae) er en marin diatomé (kiselalge) tilhørende divisjonen Ochrophyta og den eneste arten innenfor genuset *Phaeodactylum* (Guiry & Guiry, 2017). Diatomeer er en stor gruppe mikroalger av rundt 200 000 arter som finnes både i hav og ferskvann (Armbrust, 2009). De kjennetegnes av et karakteristisk skall dannet av intrikate strukturer av silika (SiO₂) (Mishra et al., 2017). Det er anslått at diatomeer oppstod for minst 180 millioner år siden ved en endosymbiose mellom en rødalge og en heterotrof eukaryot og at de står for omlag 32 % av primærproduksjonen utført av fytoplankton (Armbrust, 2009; Uitz et al., 2010). Det finnes to hovedformer av diatomeer, alger med radiær symmetri, som er de eldste og alger med symmetri om en linje, *P. tricornutum* tilhører sistnevnte gruppe. Full genom-sekvensering av *P. tricornutum* har vist et stort antall bakterielle gener, dette er et resultat av horisontal genoverføring og trolig en viktig grunn til at diatomeer evolusjonært sett er en så vellykket gruppe organismer (Bowler et al., 2008). *P. tricornutum* har blitt mye studert som modellorganisme for diatomeer fordi den er enkel å dyrke og holde i kultur, da den vokser hurtig og tåler store svingninger i både lys, næringstilgang og pH (Borowitzka & Volcani, 1978; Falkowski & LaRoche, 1991). Den har mindre silikat i celleveggen enn andre diatomeer og kan vokse selv uten tilgang på mineralet (Borowitzka & Volcani, 1978; Liu et al., 2009). Ved fotoautotrofe forhold ligger lipidinnholdet på 20-30 % av tørrvekt (Chisti, 2007) og innholdet av EPA kan utgjøre opp til 35 % av totale fettsyrer (Yongmanltchal & Ward, 1992). *P. tricornutum* kan vokse mikсотroft på en rekke organiske karbonsubstrater, deriblant glukose, glyserol og acetat, og mikсотrof dyrking er vist å kunne øke både biomassekonsentrasjon og fettsyreinnhold (Ceron Garcia et al., 2006; Garcí et al., 2000; Liu et al., 2009). Denne mikroalgen er polymorf og inntar tre distinkt ulike celleformer, en egenskap ingen andre diatomeer har etter det man kjenner til. Disse fenotypene er fusiform (vanligst), oval og triradiat (minst vanlig) (Figur 1a og b). Studier har vist at algen kan skifte om fra en form til en annen ved sub-optimale miljøforhold, hvor en større grad av ovale celler observeres ved stress (Cui et al., 2019; Martino et al., 2007).

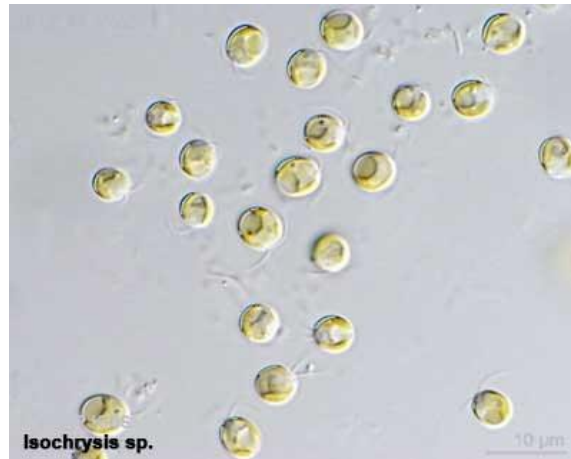


Figur 1. a) Lysmikrograf av de morfologiske formene av *P. tricornutum*: venstre, fusiform, oppe til høyre, triradiat, nede til høyre, oval. **b)** lysmikrograf av klynge med *P. tricornutum* celler. Foto av Allesandra De Martino. Bildet er hentet fra <https://media.springernature.com/lw685/springerstatic/image/art%3A10.1186%2Fgb-2008-9-12-245/MediaObjects/13059_2009_Article_1829_Fig1_HTML.jpg?as=webp>.

2.2 *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana (klasse: Prymnesiophycidae) er en marin mikroalge tilhørende divisjonen Haptophyta (Guiry & Guiry, 2017). Den har en oval celleform, gyllenbrun farge og beveger seg ved hjelp av to flageller (Figur 2) (Kim, 2015). Haptofyttene er blant de mest tallrike eukaryote mikroalgene i havene og kjennetegnes av haptonema, et påheng som er antatt å bidra til fagocytose og til å feste cellen til overflater (Eikrem et al., 2016). Hos enkelte arter kan lengden på haptonema være opp til 100 μm i lengde, mens den hos *I. galbana* er svært kort (1-2 μm). Den er ikke kalsifiserende, slik flertallet av haptofytter er og mangler en distinkt cellevegg (Eikrem et al., 2016; Liu & Lin, 2001). *I. galbana* er interessant på grunn av dens høye innhold av den flerumettede omega 3 fettsyren DHA (opp til 17, 5% av totale fettsyrer) (Chisti, 2007; Liu et al., 2013), den er også rik på fucoxanthin - et verdifullt pigment som kan virke krefthemmende og ha en insulinregulerende effekt i tillegg til flere andre positive helseeffekter (Kim et al., 2012; Kotake-Nara et al., 2005; Miyashita et al., 2011). Mellom 25-33% av tørrvekten til *I. galbana* utgjøres av lipider (Chisti, 2007) og den er en av de mest benyttede algene i marin oppdrettsindustri hvor den blir brukt enten direkte eller indirekte som føde til både fisk, reker og skalldyr (Spolaore et al., 2006). Miksotrof

kultivering av *I. galbana* med tilskudd av glukose og glyserol er vist å kunne øke produksjon av biomasse og lipidproduktivitet betydelig (Alkhamis & Qin, 2013; Babuskin et al., 2014).



Figur 2. Lysmikrograf av *I. galbana*. Foto av: Ukjent. Bildet er hentet fra https://cdn.shopify.com/s/files/1/1057/2534/products/isochrysis_t_iso_reefsnow_600x.jpeg?v=1511103160.

2.3 Industriell produksjon av mikroalger

2.3.1 Muligheter

I dag er det stort press på landarealer som følge av sterk befolkningsvekst, ekspanderende byer, utbygging av nødvendig infrastruktur og ikke minst til produksjon av mat (Lawrence & Vandecar, 2015). Mikroalgeproduksjon legger beslag på mindre landarealer enn det som kreves for planteavlinger og gir langt høyere energiproduksjon per arealenhet, da mikroalger har betydelig høyere vekstrate og lipidproduksjon enn karplanter (Minowa et al., 1995). Landarealer som i dag blir brukt til dyrking av planter til fôr-industri og biodieselproduksjon vil kunne frigjøres ved overgang til produksjon av mikroalger for disse formålene (Chisti, 2007). Olje fra fisk og krill er hovedkildene til EPA og DHA i dagens marked (Frost, 2010), rundt 80 % av all fiskeolje produsert går til akvakultur-sektoren (Toppe). I dag utgjør fisk og marine invertebrater opp mot 50 % av det menneskelige konsumet av animalsk protein (Godfray et al., 2010) og fisk er samtidig hovedkilden for omega-3 i menneskelig diett (Bimbo, 2013). Det er en voksende bekymring rundt reduksjon av fiskebestander og andre marine organismer som følge av overfiske og klimaforandringer (Altieri & Gedan, 2015; Free

et al., 2019; Pauly et al., 2002), noe som innebærer at vi blir nødt til å finne alternative næringskilder for å mette en stadig økende verdensbefolkning. Ved å ta i bruk mikroalger i produksjon av fôr og omega-3 vil det kunne redusere presset på marine økosystemer som følge av overfiske. Flere studier har vist at opptak av EPA og DHA fra fosfolipider (PL) virker å være mer effektivt enn opptak fra triglyserider (TG) (Ahmmed et al., 2020; Konagai et al., 2013). Fiskeolje består i hovedsak av nøytrale lipider, mens mikroalgene også lagrer lipider som glyko- og fosfolipider, noe som kan bety at næringsverdien i olje fra mikroalger er høyere enn i olje fra fisk. I tillegg tyder flere studier på at omega-3 i PL-form mer effektivt krysser blod/hjerne barrieren, noe som er spesielt interessant da DHA utgjør 25 % av lipidene (wt%) i hjernebarken hos mennesker og omega-3 fettsyrer er tett knyttet til kognitiv funksjon (Guesnet & Alessandri, 2011; Konagai et al., 2013). Næringsverdien i olje fra mikroalger kan også være forhøyet i forhold til fiskeolje på grunn av komponenter som karotenoider og andre antioksidanter (Ryckebosch et al., 2014).

Miksotrofe mikroalger kan i tillegg til økt produktivitet redusere kostnader forbundet med produksjon. Flere studier har vist at miksotrofe mikroalger kan benyttes i rensing av avløpsvann (Clarens et al., 2010). En slik produksjon vil kunne ha nytteverdi på flere områder gjennom reduserte produksjonskostnader i form av næringstilførsel, samtidig som det kan bidra til å redusere belastning på miljøet. Miksotrofe algekulturer dyrket med lys/mørke-syklus vil også redusere energiforbruk og kostnader knyttet til belysning som er en stor utgiftspost i kultivering av mikroalger i lukkede systemer.

Flere mikroalger har blitt genmodifisert for å øke produksjon av biomasse, lipider eller andre komponenter (Beacham et al., 2015; Hawkins & Nakamura, 1999; Perin et al., 2015).

P. tricornutum har blitt genmodifisert til å syntetisere og akkumulere større mengder DHA i tillegg til sitt høye innhold av EPA (Hamilton et al., 2015; Sayanova & A Napier, 2016), noe som kan gjøre den spesielt interessant for storskala industriell omega-3 produksjon ettersom de fleste alger kun produserer store mengder av *enten* EPA eller DHA. Det finnes også transgene planter som kan vokse raskere og produsere større mengder av omega-3 fettsyrene enn villtyper, men storskala dyrking vil måtte skje i åpne økosystemer som medfører risiko for uønsket spredning av gener (Qi et al., 2004). Dette er noe man i langt større grad kan unngå ved produksjon av genmodifiserte alger i lukkede systemer.

2.3.2 *Utfordringer*

Hovedproblemet vi står ovenfor ved produksjon av mikroalger er langt på vei at de prosesssteknologiske kostnadene per dags dato er såpass høye at planteavliger likevel er det mest økonomisk lønnsomme alternativet, til tross for mikroalgenes høyere produktivitet. Dyrking av mikroalger krever fysiske anlegg, store mengder lys, temperaturer normalt sett i området 20-30 °C, salter og uorganiske elementer i vekstmedium og karbondioksid. De ulike artene av mikroalger har naturlig nok særegne krav til vekstforhold. Komposisjon av biomassen, særlig fettsyresammensetningen kan variere med vekstfase og kultiveringsforhold som temperatur, pH, salinitet, lysintensitet og næringssammensetning i medium (Khan et al., 2018). En forståelse for algenes respons på disse faktorene er derfor essensielt for å kunne oppnå en mest mulig effektiv produksjon. Det er nødvendig å identifisere de mest økonomisk lønnsomme artene å dyrke i storskala, noe som også innebærer å optimalisere produksjonsmetodene for å maksimere utbytte og redusere utgifter i form av f.eks. næringstilskudd og elektrisitet til lys og temperaturregulering.

Dersom vi kan oppnå en mer økonomisk gunstig produksjon gjennom reduserte opp- og nedstrømningskostnader, vil algeproduksjon ha potensiale til å kunne erstatte en rekke produksjonsformer som omega-3 produksjon fra fisk og fossil drivstoffproduksjon og dermed bidra til å redusere press på økosystemer og naturressurser. For biodrivstoffproduksjon fra mikroalger er kostnadene forbundet med uthenting, oppkonsentrering og prosessering av karbohydrater og fettsyrer en stor utfordring som må løses før mikroalger blir et kostnadmessig konkurransedyktig alternativ til dagens biodrivstoffproduksjon (Khan et al., 2018; Zhan et al., 2017). Av den grunn rettes det større fokus mot mulighetene for produksjon av også andre kommersielt interessante produkter, deriblant omega-3 fettsyrer og dyre-fôr. Når det gjelder produksjon av omega-3 konsentrat fra mikroalger er kostnadene høye og kan enda ikke konkurrere med lønnsomheten i omega-3 produksjon fra fisk og krill (Adarme-Vega et al., 2012; Patil et al., 2005). En mulighet for å øke utbyttet fra mikroalgeproduksjon vil være koproduksjon av andre verdifulle komponenter fra biomassen, eller å kombinere produksjonen med annen industri, hvor avfall i form av CO₂ eller organiske komponenter kan fungere som substrat for mikroalgene (Christenson & Sims, 2011; Halim et al., 2016).

Sollys er en utfordring når det kommer til dyrking av mikroalger i Norge. Bestråling av sollys er en funksjon av breddegrad og i Norge er det årlige gjennomsnittet på omlag 100W/m² i

døgnet, tilsvarende $457 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, hvor sørlige deler av landet og innland mottar større mengder sollys enn nordlige deler og kyststrøk. Store sesongvariasjoner ligger bak dette gjennomsnittstallet med verdier fra $18\text{-}64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i januar til $759\text{-}1047 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i juli (Hagos et al., 2014). Industriell produksjon av mikroalger i lukkede reaktorer vil ikke utelukkende kunne basere seg på naturlig sollys gjennom hele året, og utnyttelse av miksotrofe arter mikroalger vil kunne bidra til å gjøre produksjonen mer lønnsom ved å redusere utgifter til kunstig belysning og potensielt føre til økt produktivitet.

Utforming av bioreaktor benyttet til dyrking spiller en sentral rolle for produktivitet av mikroalger. Det arbeides med designutvikling av fotobioreaktorer for industriell skala som gjør det mulig å oppnå lønnsom massekultivering. Yongamanaltchal et.al (1992) demonstrerte ved dyrking av *P. tricornutum* i batch at et høyt overflate/volum-forhold i reaktor førte til betydelig høyere vekstrate og total biomasse (Yongmanltchal & Ward, 1992), som igjen har sammenheng med at cellenes tilgang på lys er større ved høyere overflate/volum-forhold. Selvskygging av celler i kultur er en kjent utfordring ved kultivering, som til en viss grad kan motvirkes ved systemer for omrøring/miksing av kultur. Slike observasjoner understreker viktigheten av å benytte test-reaktorer som i størst mulig grad simulerer dimensjoner av reaktor for pilotstudier og produksjon, som er viktig for å kunne forutse produksjon i storskala med større sikkerhet.

2.4 Sentral karbonmetabolisme i mikroalger

Den sentrale karbonmetabolismen i fototrofe mikroalger er sammensatt av prosessene fotosyntese, glykolyse, pentosefosfatveien, sitronsyresyklus og oksidativ fosforylering (Baroukh et al., 2014; Yang et al., 2000). Fotosyntesen består av to steg, det lysavhengige og den lysuavhengige Calvinsyklusen. I det lysavhengige steget blir oksygen og energibærerne ATP og NADPH produsert fra vann og energi fra lys. Energibærerne transporteres til stroma av kloroplasten og benyttes til fiksering av karbondioksid gjennom Calvinsyklusen. Resultatet av prosessen er sukkeret glycerinaldehyd 3-fosfat (GAP). GAP transporteres videre til cytosol hvor det går inn midt mellom glykolysens øvre og nedre del. Øvre del av glykolysen genererer glukose 6-fosfat (G6P) som benyttes enten for syntese av karbohydrater eller til generering av NADPH gjennom pentosefosfatveien. I den lavere del av glykolysen dannes det fosfoenolpyruvat (PEP) som enten går til syntese av lipider i kloroplasten, eller inn i

sitronsyresyklus som skjer i mitokondriet hvor det produseres en rekke mellomprodukter for syntese av biomasse, klorofyll, DNA, RNA og proteiner. ATP genereres fra kofaktorene FADH og NADH gjennom oksidativ fosforylering (McKee & McKee, 2009).

2.5 Lipider i mikroalger

Mikroalger er kilde til flere høyverdige lipider og flere strategier kan benyttes til å øke lipidinnhold. Mangel på næringsstoffer, spesielt nitrogen er en viktig stimulerende faktor til økt lipid-syntese og akkumulering for mange arter (Popko et al., 2016). Også introduksjon av andre stressfaktorer i form av lysintensitet, temperatur og salinitet kan benyttes for å drive opp lipidproduksjon (Cheirsilp & Torpee, 2012; Sukenik & Wahnon, 1991; Zhu et al., 1997). Det finnes to hovedklasser av lipider i alger: Nøytrale lipider som triacylglyseroler (TAG) som benyttes til energi eller lagres i lipiddråper, og polare lipider som glyko- og fosfolipider som fungerer som strukturelle komponenter i cellemembraner og som signalmolekyler og mellomprodukter i lipidsyntese (Borowitzka & Moheimani, 2013). Mikroalger lagrer nøytrale lipider intracellulært i organeller kalt lipiddråper omgitt av en rekke proteiner som antas å bidra med enzymatisk aktivitet i lipidmetabolismen, stabilisering av organellen og hindre fusjon mellom lipiddråper (Goold et al., 2015). De fleste mikroalger lagrer hovedsakelig nøytrale fettsyrer i form av TAG, men flere haptofytter, deriblant *I. galbana*, produserer istedenfor TAG ulike langkjedede ketoner kalt alkenoner (Hirakawa, 2017). Generelt inneholder TAG i mikroalger hovedsakelig mettede og enumettede fettsyrer, mens de flerumettede fettsyrene finnes som polare lipider i membraner (Remmers et al., 2017; Siaut et al., 2011).

Fytoplankton utgjør primærprodusentene av omega-3 fettsyrer som akkumuleres oppover i den marine næringskjeden. Interessen for å utnytte disse organismene direkte for ekstraksjon av EPA og DHA er stigende fordi forbruket og etterspørselen etter omega-3 produkter er økende samtidig som presset på mange fiskebestander også øker (Adarme-Vega et al., 2012; Pauly et al., 2002). Eikosapentanoensyre (EPA) og Dokosapentanoensyre (DHA) er fettsyrer som må tilføres gjennom kosten ettersom de i minimal grad kan syntetiseres i menneskekroppen fra de essensielle fettsyrene Linolsyre (LA) og Alfolinolsyre (ALA) (Pawlosky et al., 2001). Det siste århundret har det vært en stor økning i inntaket av omega-6-fettsyrer i menneskers kosthold, og forholdet mellom inntak av omega-6 og omega-3 fettsyrer

har gått fra 1-2:1 til 20-30:1 (Simopoulos, 1999). Omega-3 fettsyrer har flere beviste helsefordeler og er nødvendige for både dyr og mennesker, det er påvist at de har antiinflammatorisk virkning og positive effekter på fosterutvikling og på kardiovaskulær helse (Helland et al., 2008; Serhan et al., 2008). Eikosanoider fra omega-6 fettsyrer har derimot proinflammatorisk virkning og et høyt inntak av omega-6 fettsyrer er forbundet med en rekke inflammatoriske sykdommer (Patterson et al., 2012). Globale og nasjonale helsemyndigheter råder derfor generelt til et økt inntak av omega-3 (Joint, 2011; Simopoulos et al., 1999).

2.6 Dyrkingsmetoder

Dyrking av mikroalger kan gjøres i åpne eller i lukkede systemer, hvorav de fleste kommersielle arter blir produsert i førstnevnte (Guevara-Gonzalez & Torres-Pacheco, 2014). Åpne systemer er dammer eller bassengkonstruksjoner hvor algekulturene er utsatt for det omkringliggende miljøet. Slike systemer er effektive for massekultivering, rimeligere og lettere å vedlikeholde enn lukkede systemer. Ulempene er at de i større grad enn lukkede systemer er utsatt for kontaminasjon i form av bakterier og andre algearter og svingninger i temperatur og belysning (Kim, 2015; Kim et al., 2012). I åpne systemer må dyrking av algene skje i selektive miljøer for å begrense kontaminasjon, for eksempel høye pH- eller saltnivåer, noe som gjør at en slik produksjonsmetode begrenser seg til relativt få arter (Borowitzka, 1999). I lukkede systemer er kulturen skjernet for det omkringliggende miljøet, noe som gir større kontroll over prosessen ved at vekstforhold i stor grad kan styres. Investerings- og driftskostnadene er høyere enn ved åpne systemer som følge av mer avanserte tekniske installasjoner samt drift og vedlikehold av disse, men produktiviteten er også betydelig høyere i lukkede systemer (Richmond, 2008; Ruiz et al., 2016). Valg av dyrkingssystem avhenger av alge og produktet som skal utvinnes, men også av geografisk plassering, da åpne systemer vil være mest produksjonseffektive i områder med stabilt klima med mye sol og lite nedbør (Lucas et al., 2019). Felles for alle dyrkingssystemer er at de trenger tilførsel av CO₂, oksygen og en lyskilde. En form for miksing er nødvendig for å sørge for nærings- og gassutveksling og for å motvirke fenomenet kalt «self shading» som er effekten av at celler nær lyskilde skygger for celler med større avstand til lyskilden (Cheirsilp & Torpee, 2012).

Det finnes tre hovedformer for kultivering i lukkede systemer – batch, semi-kontinuerlig og kontinuerlig dyrking. En tradisjonell batch-kultur er den enkleste formen som innebærer

dyrking i medium med en begrenset mengde næringsstoffer uten tilførsel eller uttapping underveis (Becker, 2004). I en slik kultur vil man kunne observere ulike faser av vekst. *Lag-fasen* som opptrer først er en periode med lav veksthastighet der cellene i kulturen tilpasser seg sitt nye miljø. Deretter øker veksthastigheten og kulturen entrer *eksponentiell fase* som kjennetegnes ved nettopp eksponentiell vekst som følge av gode vekstforhold og rik tilgang på næring og lys. Når ett eller flere substrater i medium blir begrensende, eller en eller flere faktorer inhiberer veksten, vil kulturen gå over i *stasjonær fase*, hvor antallet celler som deles tilsvarer antallet celler som dør. Når inhiberende faktorer og mangel på næringsstoffer blir mer uttalte vil kulturen etterhvert gå inn i *dødsfase* hvor flere celler dør enn antall celler som deles. En semi-kontinuerlig kultur kjennetegnes ved at det periodisk hentes ut et volum av kulturen som blir erstattet med friskt medium. En kjemostat er en type kontinuerlig kultur der tilførsel av ferskt medium er det samme som mengden kultur som fjernes, slik at kulturvolumet og det kjemiske miljøet er det samme hele tiden (Becker, 2004). Dette gir muligheten til å studere en kultur ved spesifikke vekstrater eller forhold over tid. Vekstraten i en kjemostat er den samme som fortynningsraten (Ziv et al., 2013). I en tradisjonell kjemostat er fortynningsraten bestemt av operatør gjennom satt pumpehastighet. En turbidostat er en variant av kjemostat hvor tilførsel av medium reguleres etter turbiditeten i kulturen, fortynningsraten er dermed bestemt av algens vekst i de gitte forholdene. En sekundær lyssensor registrerer hvor mye lys som slipper gjennom kulturen, og når den overstiger en viss tetthet blir medium tilført til tettheten igjen er lik forhåndsbestemt grad.

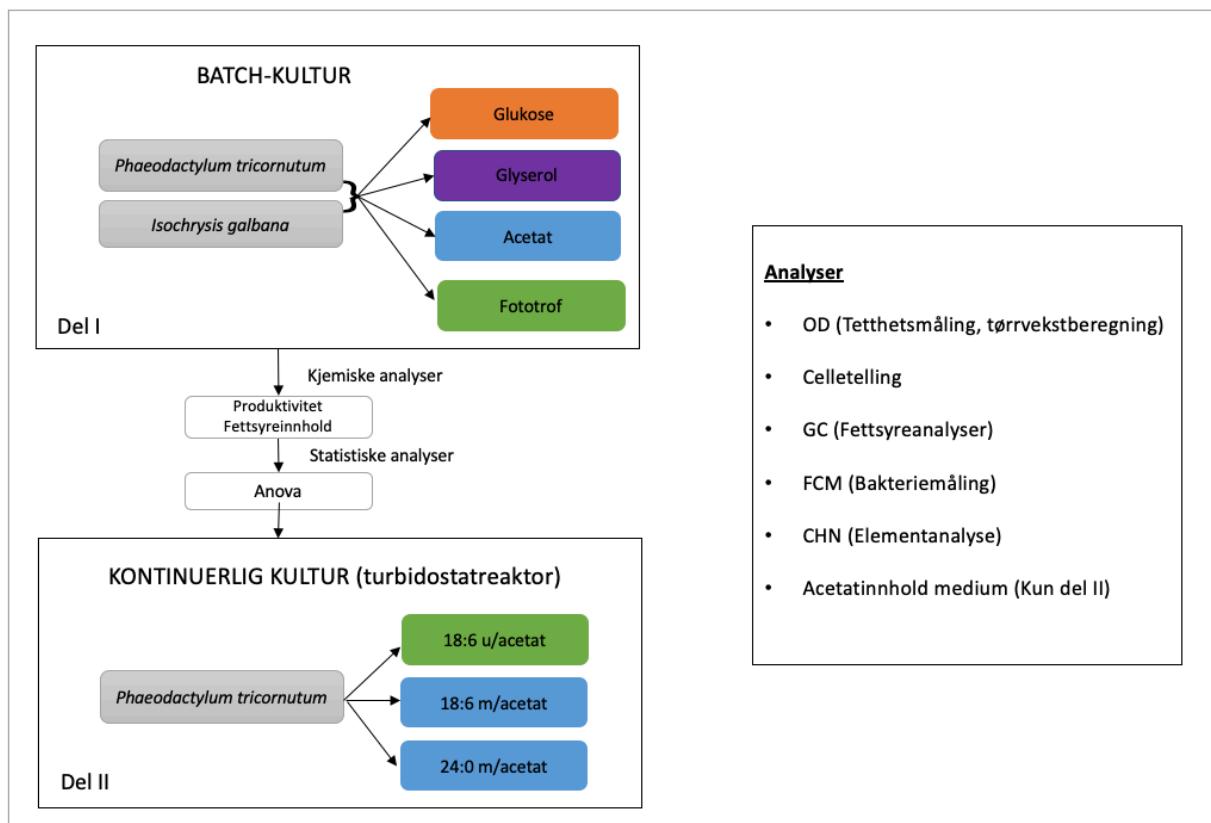
3 Materialer og metoder

For å studere effekten av miksotrofi på vekst og fettsyresammensetning av algene *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis galbana* og vurdere potensialet for utnyttelse av miksotrofi i kommersiell produksjon foretok jeg først en kartlegging. I kartleggingen ble begge artene dyrket i batch-kultur med 24-timers belysning i 23°C uten noen form for organisk karbon tilsatt. Videre utførte jeg dyrking med de organiske karbonkildene glukose (C₆H₁₂O₆), glyserol (C₃H₈O₃) og natriumacetat (C₂H₃NaO₂), som alle ble sammenlignet med resultatene fra den fotoautotrofe kulturen. Resultatene fra den initielle kartleggingen brukte jeg til å velge hvilken av de to algene og hvilket karbonsubstrat som var mest interessant å gå videre med for dyrking som kontinuerlig kultur i en turbidostat-reaktor.

I turbidostat-reaktoren ble det utført tre forsøk. Disse var 18:6 L/M (lys/mørke)-syklus uten acetat, 18:6 L/M-syklus med acetat og 24 timers belysning med acetat. Resultatene fra forsøk med L/M-syklus ble sammenlignet med resultatene fra 24 timers belysning for å studere effekt av L/M- syklus på vekst og fettsyresammensetning, mens resultat fra de to forsøkene med L/M-syklus ble vurdert mot hverandre for å danne et bilde av effekten av acetat på vekst og fettsyresammensetning. Figur 3 viser bilder fra dyrkingsforsøkene og flytskjema for arbeidet er vist i figur 4.



Figur 3: Bilde til venstre: Batch-kulturer av *P. tricornutum* dyrket i 300 ml glassrør i temperaturkontrollert vanntank. Bilde til høyre: Turbidostat-reaktor med kultur av *P. tricornutum*. Foto: privat.



Figur 4: Flytskjema for arbeidet. Resultater fra dyrking av *P. tricornutum* og *I. galbana* i batch-kultur (del I) med og uten de organiske karbonsubstratene glukose, glyserol og acetat ledet til utvalg av *P. tricornutum* videre i dyrkingsforsøk som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor med og uten acetat (del II). De samme tekniske analysene (tetthetsmåling, celledtelling, fettsyreanalyse og elementanalyse) ble utført for del I og del II, med unntak av måling av acetatinnhold, som kun ble gjort i del II.

3.1 Mikroalger og karbonsubstrater

3.1.1 Mikroalger

Mikroalgene benyttet i prosjektet er *Phaeodactylum tricornutum*, isolat B58 og *Isochrysis galbana*, isolat CCMP 462. *P. tricornutum* B58 er et lokalt isolat fra Puddefjorden i Bergen, Norge. Denne ble tidligere beskrevet som ND58 (Prestegard et al., 2009). *I. galbana* CCMP 462 er et isolat fra Mussel Point, Pacific Grove, California USA (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences).

100 ml inokulum fra begge alger ble vedlikeholdsdyrket i 200 ml erlenmeyerkolber med Walnes medium (Walne, 1970) laget med autoklavert 100 % sjøvann i inkubatorskap ved 15°C med 14:10 L/M belysning ($\sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ovenfra, $\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fra sider).

3.1.2 Vekstmedium og organiske karbonsubstrater

I alle vekstforsøk i prosjektet ble det benyttet f/4-medium (Vedlegg C) tillaget med 100 % autoklavert sjøvann.

Stamløsninger med glukose (Sigma Aldrich) og natriumacetat (Merck) ble tillaget i 10 ml polypropylenrør (Falcon) med MQ-vann og sterilfiltrert til nye rør. Viskøs glyserol (Sigma Aldrich) ble overført direkte til 10 ml polypropylenrør med bruk av sterilteknikk (Vedlegg C).

3.2 Vekstforsøk

3.2.1 Batch-kulturer

P. tricornutum og *I. galbana* ble dyrket som 300 ml batch-kultur (Figur 3) med tilsetning av glukose, glyserol, acetat og uten tilsetning av organisk karbon (heretter omtalt som fotoautotroft dyrket kultur) som vist i flytskjema (Figur 4). 30 ml inokulum ble resuspendert i ca. 270 ml F4 medium og overført til 300 ml glass-sylindre og plassert i temperaturkontrollert vanntank som holdt 23°C (+/-0,5). CO₂ ble tilført kulturer ved kontinuerlig bobling av 1% CO₂-anriket luft til bunnen av alle rør. Kulturer ble blandet ved fysisk omrøring 1-2 ganger per dag i tillegg til blandingen fra gasstilførsel. Konstant lys ble sikret ved 6 horisontale fluorescensrør (Phillips MASTER, TL-D 90 Graphica 58W/95) festet på baksiden av vanntanken. Initiell lysstyrke var $15 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ og den ble oppjustert med det dobbelte daglig (når måling av OD bekreftet dobling i tetthet i alle kulturer) opp til $300 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Lysmåling ble gjort ved bruk av håndholdt fotometer (LI-250A, LI-COR biosciences, UK). Prøverør med *P. tricornutum* ble gjennom forsøket tilsatt karbonsubstrat med sluttkonsentrasjoner på: 0,05 M glukose, 0,1 M glyserol eller 0,005 M natriumacetat. Prøverør med *I. galbana* ble tilsatt karbonsubstrat med sluttkonsentrasjoner

på: 0,02 M glukose, 0,05 M glyserol eller 0,01 M natriumacetat. Alle kulturer ble dyrket i triplikater. Tilsetning av karbon (C) skjedde gradvis, med 10, 40 og 50% av total mengde, med noen dagers mellomrom for tilvenning til C-nivåer. Første tilsetning skjedde ved start av eksperiment, deretter ved bekreftet eksponentiell vekst og siste tilsetning etter bekreftet fortsatt eksponentiell vekst.

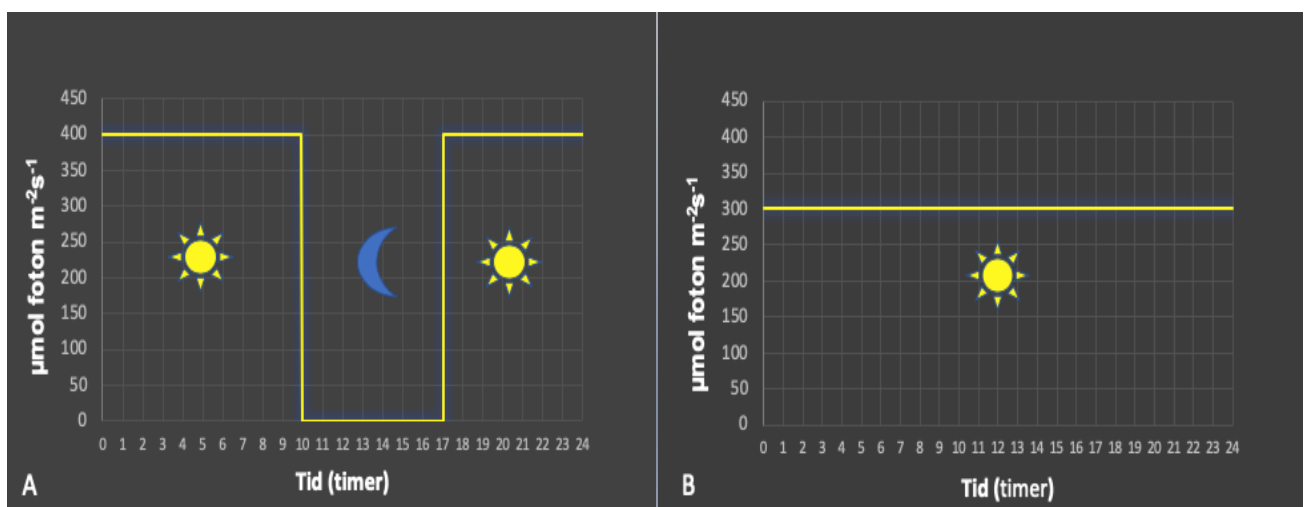
3.2.2 Kontinuerlige kulturer

P. tricornutum ble dyrket i flat-panel 3,8 L fotobioreaktor (Algaemist-S, Ontwikkelwerkplaats, Wageningen UR, Nederland). Reaktoren er utstyrt med LED lamper som belyste kulturen i glasskolben fra 14 mm avstand. Luft ble tilført kulturen (398 ml min^{-1}) gjennom $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filter (Acrodisc1 PTFE filters, Pall Corporation, USA). CO_2 ble tilført gjennom $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filter (Acrodisc1 PTFE filters, Pall Corporation, USA) når pH gikk over setpoint, pH setpoint var 7,9. Temperatur ble satt til $\sim 23^\circ\text{C}$ og ble ved avvik fysisk opp- eller nedregulert ved tapping av varmt eller kaldt vann til reservoaret for kjølevann som sirkulerer i rom utenfor kultur-kammeret som følge av at det innebygde oppvarmingssystemet var defekt. I forkant av det første forsøket i fotobioreaktoren ble kolben sterilisert ved autoklaving (121°C , 20 min). Kultiveringsparametrene pH, temperatur, inn- og utgående lys, strøm av luft og CO_2 ble registrert elektronisk hvert minutt og loggført i program utviklet i labVIEW ved universitetet i Wageningen. (Vedlegg B.3).

Jeg satte opp følgende tre kontinuerlige kulturer av *P. tricornutum*: 18:6 L/M syklus uten organisk karbonsubstrat, 18:6 L/M syklus med acetattilsetning, og kontinuerlig lys (24h) med acetattilsetning (Figur 4). Kulturer i alle forsøk mottok lik mengde $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. For kulturer med 18:6 L/M-syklus innebar det $400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lysstyrke i periode med lys, og $300 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for kultur med 24-timers belysning (Figur 5). Ved oppstart av kontinuerlig kultur ble 100 ml inokulum oppkonsentrert ved sentrifugering og tilsatt 270 ml F4-medium. Sentrifugering ble utført for å redusere bakterieinnhold og for å raskere oppnå en ønsket celledetthet i kultur.

Kulturene ble dyrket til «steady state» og opprettholdt på dette nivået i tre dager. «Steady state» vil si forholdet der vekstraten er konstant i et miljø der alle kultiveringsparametere (pH, gass, lys, næringsforhold, celledetthet, temperatur etc.) er konstante (Málek & Fenel, 2013).

I forsøk med L/M-syklus var ikke lys eller celletetthet konstant over 24 timer, og jeg anså kulturene å være i «steady state» når verdier fra spektrofotometriske målinger, registrerte kultiveringsparametere og forbruk av medium var like over de tre dagene. I forsøkene med 6 timer mørkeperiode ble det gjennom de 3 dagene av «steady state» tatt ut prøver for måling av fettsyreinnhold, innhold av karbon og nitrogen, bakteriemåling og celledelling like før og på slutten av nevnte periode, mens OD ble målt rett før og hver time under mørkeperiode. I forsøk med kontinuerlig lys ble det gjennom «steady state» tatt prøver for fettsyreinnhold, innhold av karbon og nitrogen, bakteriemåling og celledelling en gang per dag, samt tetthetsmålinger av kultur.



Figur 5. De to ulike lysforholdene benyttet i forsøk som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor med A) 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 18:6 L/M-syklus og B) 300 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ved kontinuerlig belysning. X-akse representerer tid i timer, Y-akse representerer lysstyrke i $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.3 Analyser

3.3.1 Spektrofotometri

Fot alle batchkulturer målte jeg daglig optisk tetthet (OD) spektrofotometrisk ved 750 nm bølgelengde (UV-1201V, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Tetthetsmålingene ble benyttet til å lage vekstkurver og kalibrere tørrvekt. Prøver til bakterietelling, fettsyre-, og elementanalyser ble tatt en gang i hver fase. Ved $\text{OD} > 0,5$ ble prøven fortennet slik at målt verdi alltid lå mellom 0,2 og 0,5. Det ble også gjort målinger ved 680 nm. Forholdet mellom 680 og 750 nm ble sett på som indikasjon på endringer i kulturenes klorofyllnivå eller potensielle bakterielle kontaminasjoner. Optisk tetthet som mål for vekst i turbidostat-

forsøkene ble målt ved bruk av spektrofotometer (UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) for å fastslå «steady state» hvor det ble gjort prøvetaking til fettsyre-, bakterie- og elementanalyser. Nevnte prøver ble gjort før og etter mørkeperiode i forsøk med L/M-syklus og en gang daglig i forsøk med 24-timers belysning. Ved OD > 0,5 ble prøven fortynnet, slik at målt verdi lå mellom 0,2 og 0,5. Også her ble forholdet mellom 680 og 750 nm brukt som indikasjon på klorofyllnivå eller potensielle kontaminasjoner. Tørrvekt ble kalibrert ut fra målinger av optisk tetthet ved 750 nm.

3.3.2 Celletelling

Antall algeceller ble telt i hemocytometer (Bürker) med 400x forstørrelse for å bekrefte utviklingen i OD-grafene. Det ble samtidig sett etter potensielle kontaminasjoner og uregelmessigheter i celleform. I dyrkingsforsøk i turbidostat ble også fordelingen mellom fusiforme, ovale og triradierte celler studert. I forkant av undersøkelse i mikroskop ble fortynnet prøve fra tetthetsmåling videre fortynnet slik at antallet celler i hvert av de 9 kvadratene var på mellom 40-80 celler.

3.3.3 Flowcytometri (FCM)

Estimat på bakterieinnhold i kulturene ble gjort på bakgrunn av analyser med instrumentet FACS Calibur BC Flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) etter metode beskrevet av Marie et.al (1999). 1 ml prøve fra algekultur ble fiksert med 20 µl 25 % glutaraldehyd og fiksert i 30 minutter i mørke ved 4 °C. Deretter ble de hurtigfrost i flytende nitrogen (-200 °C) og lagret ved -80 °C frem til analyse. Prøver ble tint i mørke ved 4 °C og fortynningsserie av prøvene på 10x,100x,1000x og 10000x ble tillaget med 0,2 µm filtersterilisert TE-buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), samt 3 stk negative kontroller med kun TE-buffer. Videre ble prøver og kontroller tilsatt 10 µl SYBR Green I DNA fargestoff 100x fortynnet (Life Technologies, Canada), inkubert i 10 minutter i 80 °C vannbad og oppbevart i mørke og romtemperatur for avkjøling i 30 minutter frem til analyse. Telling av bakterier i flowcytometer ble gjort med strømningshastighet på ca. 50 µl/minutt i 60 sekunder.

3.3.4 Elementanalyse (CHN)

Elementanalyser ble utført etter metode beskrevet av Pella & Colombo (Pella & Colombo, 1973). 100 µl ren prøve ble filtrert gjennom glødet 25 mm GF/F glass-mikrofiberfilter (Whatman), pakket i aluminiumsfolie og lagret ved -20°C frem til analyse. Filtrene ble så tørket i romtemperatur i 24 timer og deretter pakket med pinsett i tinnkapsler. Benk og utstyr ble vasket med etanol og pinsetter ble flammesterilisert for å unngå påvirkning av fett og støv på prøveresultater. Samtidig ble det forberedt kontroller med 10,20,50,100,150 og 250 µl asparginsyre med kjent innhold av elementene, samt tomme tinnkapsler. Innhold av karbon og nitrogen ble bestemt ved forbrenning i FLASH 2000 element-analysator (Thermo Fischer Scientific) hvor en termal konduktivitetsdetektor detekterer endring i den termale ledningsevnen hos avløpsegassen sammenlignet med referansegassen. Analysen ble utført med følgende parametere: bæregass (helium) 130 ml min⁻¹; referansegass (helium) 100 ml min⁻¹; oksygen 250 ml min⁻¹; analysetid (per tinnkapsel) 300 s.

3.3.5 Fettsyreanalyse

Prøver til fettsyreanalyse ble forberedt ved at 10 ml kultur ble sentrifugert ved 5000 rpm, supernatant fjernet og pellet lagret ved -20°C frem til analyse. Lipid-ekstraksjon og esterifisering til fettsyremetylestere ble utført eksternt, ved direkte esterifisering etter metoden til Meier et al (2006). C23:0 ble brukt som intern standard og HCl i metanol som katalysator for metylering av fettsyrer. Isooktan ble benyttet til ekstraksjon av metylerte fettsyrer og for å fortynne prøven før analyse i GC. Fremgangsmåte er blitt beskrevet i detalj av Steinrücken et.al (2017). Gasskromaografisk analyse av fettsyremetylestere ble utført etter metode beskrevet av Prestegard et al. (2016).

3.3.5 Analyse av acetatkonsentrasjon i medium av kontinuerlige kulturer

Prøver til acetatanalyse av medium ble tatt av kulturer tilsatt acetat. 1 ml prøve ble spunnet ned, supernatant overført til nytt eppendorfrør og lagret ved -20°C frem til analyse.

Konsentrasjon av acetat ble bestemt gjennom kolorimetrisk analyse ved bruk av acetat-kolorimetrisk kit (Sigma Aldrich). Analyse ble utført av forskningsassistent ved Norce, Hanna Böppe.

3.3.6 Utregninger

Tørrvekt av både *I. galbana* og *P. tricornutum* ble regnet ut ved å multiplisere verdi fra tetthetsmåling med kalibreringsfaktor (0,4171 for spektrofotometer benyttet i batch-forsøk og 0,2526 for spektrofotometer benyttet i forsøk i turbidostat) fra kalibreringskurver (av Pia Steinrücken, UiB) basert på gjentatte målinger av tetthet av *P. tricornutum* plottet mot tørrvekt. (Originalt ble alle prøver filtrert og veid, men på grunn av feil i etablert metode ble filtre tørket med lokk og resultatene viste derfor ikke sann tørrvekt. Sammenligning av filtretørrvekt av *I. galbana* og *P. tricornutum* mot tetthetsmålinger viste høy grad av likhet, utarbeiding av kalibreringskurver for *I. galbana* ble derfor ikke gjort.

Vekstrate i batch-kulturer ble regnet ut ved formel:

$$\mu = \ln(N_2/N_1) / (t_2 - t_1)$$

μ er vekstrate, N_1 og N_2 står for biomasse i gram på tidspunkt 1 (t_1) og 2 (t_2).

μ_{max} = maksimal vekstrate i batch-kulturer. (Eksponentiell vekstfase ble definert som rett linje i logaritmisk graf og maksimal vekstrate bestemt ut fra de tre dagene i eksponentiell fase med brattest kurve)

Vekstrate i «steady state» i kontinuerlig kultur tilsvarer **fortynningsrate** og regnes ut ved formel:

$$\mu = D = F/V$$

μ er vekstrate, D er fortynningsrate, F (Flow) er medium tilført kulturen per døgn, V er volum av reaktor (390ml).

Produktivitet ble regnet ut ved formel:

$$P_{biomasse} (mg L^{-1} dag^{-1}) = \frac{DW_{max} - DW_{dag 0}}{Dager}$$

Produktivitet i «steady state i kontinuerlig kultur ble regnet ut ved følgende formel:

$$P_{biomasse} (mg L^{-1} dag^{-1}) = \mu \times DW$$

Lipidinnhold ble regnet ut ved å dele fettsyrevekt på tørrvekt.

$$\%FA = \left(\frac{FA \text{ mg ml}^{-1}}{DW \text{ mg ml}^{-1}} \right) \times 100$$

Lipidproduktivitet * ble regnet ut ved følgende formel:

$$P_{lipid} (mg L^{-1} dag^{-1}) = P_{biomasse} \times \% FA$$

* Produktivitet ble regnet fra dagen maksimal OD ble målt (dermed også høyeste tørrvekt), mens fettsyremålingene ble gjort i eksponentiell fase.

3.3.8 Statistikk og programvare

Alle resultater er presentert som gjennomsnitt av biologiske triplikater og standardavviket mellom disse. One-way anova og Tukeys multiple comparison test ble benyttet for variansanalyse med 95 % konfidensintervall, der p-verdier < 0,05 ble ansett som statistisk signifikante. R Software (R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<https://www.R-project.org/>>) ble benyttet for variansanalyser og PCA- analyser og plots. På grunn av skjevfordeling av data til PCA-analyser utførte jeg logaritmisk transformasjon for å normalisere datasettet. Loggføring av data og alle andre grafiske fremstillinger ble laget ved bruk av Microsoft® Excel for macOS, Versjon 16.32.

4 Resultater

Resultater fra batch-forsøkene utgjorde som nevnt vurderingsgrunnlaget for utvalg av alge og organisk karbonsubstrat til forsøk i turbidostat-reaktor som kontinuerlig kultur. Jeg ønsket å få svar på om det var en signifikant forskjell i biomasse-produktivitet, fettsyreinnehold og fettsyresammensetning hos *I. galbana* og *P. tricornutum* ved dyrking med tilskudd av organiske karbonsubstrater sammenlignet med fotoautotrof dyrking. Videre ønsket jeg å finne ut hvilket karbonsubstrat som i størst grad stimulerte til vekst og lipidakkumulering.

4.1 Batch-forsøk

Figur 6 og 7 viser vekst av henholdsvis *P. tricornutum* og *I. galbana* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av de organiske karbonsubstratene glukose, glyserol og acetat. Tabell 1 viser vekstrater og produktivitet i de ulike kulturene.

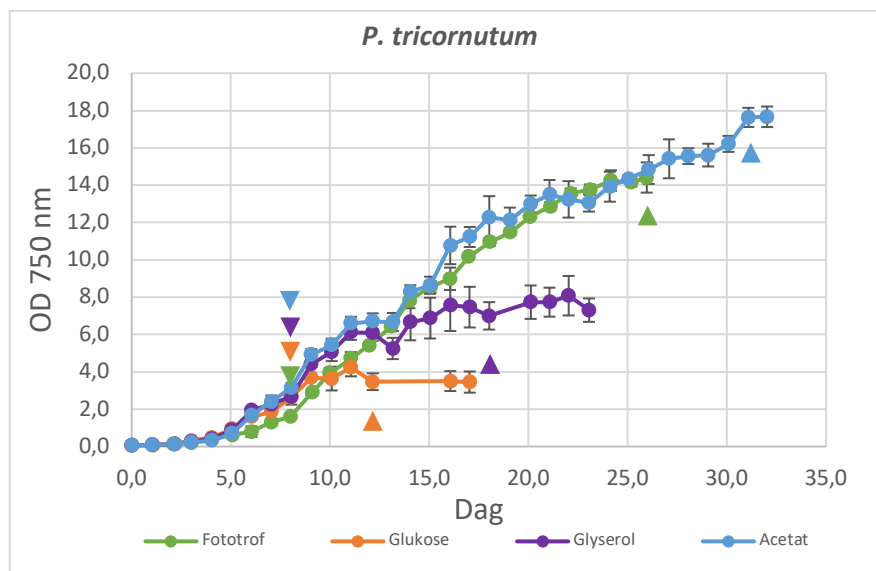
4.1.1 Vekst på organiske karbonsubstrater

Glukose, glyserol og acetat førte til ulik grad av biomasse-produktivitet (tabell 1) og lengde av vekstperiode frem til stasjonær fase inntraff (Figur 6). Fotoautotrof dyrking av *P. tricornutum* ga en produktivitet på $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mot $0,16$, $0,19$ og $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ved dyrking på henholdsvis glukose, glyserol og acetat (Tabell 1). Fotoautotroft dyrket kultur vokste i 24 dager før den gikk inn i stasjonær fase, mens kulturer der mediet var tilsatt glukose, glyserol og acetat vokste i henholdsvis 11, 16 og 31 dager før stasjonær fase inntraff.

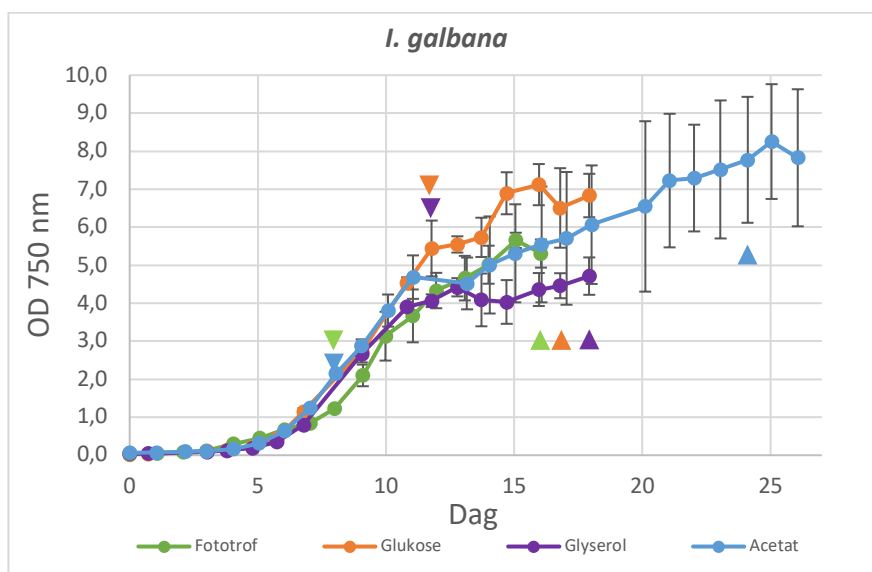
Fra tabell 1 kan man lese at de maksimale vekstratene for *P. tricornutum* dyrket med glyserol ($0,66 \text{ d}^{-1}$) og acetat ($0,64 \text{ d}^{-1}$) var signifikant høyere enn ved fotoautotrof vekst ($0,57 \text{ d}^{-1}$) med karbondioksid som eneste kilde til karbon. Maksimal vekstrate for kultur dyrket med glukose var også høyere ($0,61 \text{ d}^{-1}$) enn for fotoautotrof vekst, men forskjellen var ikke signifikant. *P. tricornutum* nådde høyere biomassetetthet ved dyrking på acetat enn fotoautotrof dyrking, med henholdsvis $7,37$ mot $6,01 \text{ g L}^{-1}$, mens tilsetning av glukose og glyserol resulterte i biomassetetthet på henholdsvis $1,77$ og $3,37 \text{ g L}^{-1}$.

I. galbana oppnådde høyest produktivitet ved tilsetning av glukose med $0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mot $0,16$, $0,14$ og $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ved henholdsvis fotoautotrof dyrking, glyserol-, og acetattilsetning (Tabell 1). Antall dager i vekst frem til stasjonær fase var på 15, 16, 13 og 24 dager for henholdsvis fotoautotroft dyrket kultur og kulturer tilsatt glukose, glyserol og acetat (Figur 7).

For *I. galbana* var de maksimale vekstratene ved dyrking med glukose og acetat signifikant høyere enn ved fotoautotrof dyrking og dyrking med glyserol med henholdsvis $0,71$ og $0,68 \text{ g/L}$ mot $0,60$ og $0,62 \text{ g L}^{-1}$. Høyest biomassetetthet ble observert i kulturene dyrket med tilsetning av acetat ($3,44 \text{ g L}^{-1}$) og med tilsetning av glukose ($2,97 \text{ g L}^{-1}$) som var signifikant høyere enn biomassen oppnådd når kulturen ble dyrket fotoautotroft ($2,36 \text{ g L}^{-1}$). Glyserol førte til en signifikant lavere biomassetetthet ($1,82 \text{ g L}^{-1}$) enn fotoautotroft dyrket kultur.



Figur 6. Gjennomsnittlig vekst for batch-kulturer av *P. tricornutum* med og uten tilsetning av organisk karbon. Y-akse representerer optisk tetthet (750 nm) og X-akse representerer tid (dager). Usikkerhetsstolper representerer standardavvik (n=3). Pilhoder viser dag for prøvetaking for eksponentiell (pilhode ned) og stasjonær fase (pilhode opp), og er fargekoordinert etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat)



Figur 7. Gjennomsnittlig vekst for batch-kulturer av *I. galbana* med og uten tilsetning av organisk karbon. Y-akse representerer optisk tetthet (750 nm) og X-akse representerer tid (dager).

Usikkerhetsstolper representerer standardavvik (n=3). Pilhoder viser dag for prøvetaking for eksponentiell (pilhode ned) og stasjonær fase (pilhode opp), og er fargekoordinert etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat)

Tabell 1. Gjennomsnittlig maksimal veksthastighet (μ_{\max} d⁻¹), biomasse-produktivitet (BM g L⁻¹ d⁻¹) og maksimal biomassetetthet (BM g L⁻¹) av *P. tricornutum* og *I. galbana* i batch-kultur ved fotoautotrof vekst og ved glukose, glyserol og acetat som organiske karbonsubstrater. Alle verdier er oppgitt med standardavvik (stdav).

| Kultur | <i>P. tricornutum</i> | | | <i>I. galbana</i> | | |
|----------|------------------------------|---|--|------------------------------|---|--|
| | μ_{\max} d ⁻¹ | produktivitet g L ⁻¹ d ⁻¹ | Maksimal biomassetetthet g L ⁻¹ | μ_{\max} d ⁻¹ | Produktivitet g L ⁻¹ d ⁻¹ | Maksimal biomassetetthet g L ⁻¹ |
| Foto | 0,57 ± 0,02 | 0,25 ± 0,01 | 6,01 ± 0,34 | 0,60 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 2,36 ± 0,08 |
| Glukose | 0,61 ± 0,03 | 0,16 ± 0,02 * | 1,77 ± 0,20 * | 0,71 ± 0,01* | 0,19 ± 0,02 | 2,97 ± 0,23* |
| Glyserol | 0,66 ± 0,01 * | 0,19 ± 0,04 | 3,37 ± 0,44 * | 0,62 ± 0,02 | 0,14 ± 0,01 | 1,82 ± 0,18* |
| Acetat | 0,64 ± 0,01 * | 0,24 ± 0,01 | 7,37 ± 0,23 * | 0,68 ± 0,01 * | 0,14 ± 0,04 | 3,44 ± 0,63 * |

*Signifikant forskjell fra fotoautotrof kultur n = 3, p < 0,05

4.1.2 Effekt av organiske karbonsubstrater på totalt lipidinnhold og fettsyreprofil

Som vist i tabell 2 varierte det totale fettsyreinnholdet i algene mellom alle dyrkingsforhold. Hos *P. tricornutum* i eksponentiell fase er totalt fettsyreinnhold (tFA) høyest i kultur tilsatt glukose (188,40 mg g⁻¹) etterfulgt av glyserol (163,76 mg g⁻¹), fotoautotroft dyrket kultur (147,95 mg g⁻¹) og acetat (133,65 mg g⁻¹). Forsøket viser at alle kulturer med unntak av den tilsatt acetat hadde et lavere innhold av fettsyrer i stasjonær fase enn i eksponentiell fase (Tabell 2). Det er viktig å understreke at et høyt standardavvik i fettsyremålinger av kultur dyrket med tilskudd av glyserol i stasjonær fase gjorde disse resultatene upålitelige. Den store variasjonen kan skyldes at de tre kulturene var i ulike vekststadium og/eller at det har skjedd en feil ved preparering eller analyse.

For *I. galbana* førte tilskudd av glukose og acetat til signifikant høyere tFA enn fotoautotroft dyrket kultur i eksponentiell fase, med lipidinnhold på henholdsvis 127,03 og 126,82 mg g⁻¹ mot 74,12 mg g⁻¹ i fotoautotroft dyrket kultur. Glyserol førte til et høyere lipidinnhold enn i fotoautotroft dyrket kultur med 92,43 mg g⁻¹, men forskjellen var ikke signifikant.

Fotoautotroft dyrket kultur og kultur tilsatt glyserol hadde et høyere totalt fettsyreinnhold i stasjonær fase enn i eksponentiell fase, mens kulturene tilsatt glukose og acetat hadde et lavere totalt fettsyreinnhold i stasjonær fase (Tabell 2).

Tabell 2. Totalt fettsyreinnhold i *P. tricornutum* og *I. galbana* i eksponentiell og stasjonær fase. Alle verdier er oppgitt i mg g⁻¹ dw BM med standardavvik (stdav) (n=3). Utheving i rødt markerer resultat ansett som upålitelig.

| Alge | Kultur | tFA eksp.fase (mg g ⁻¹ dw) | tFA stasj.fase (mg g ⁻¹ dw) |
|-----------------------|----------|--|---|
| <i>P. tricornutum</i> | Foto | 147,95 ± 17,23 | 113,29 ± 19,34 |
| | Glukose | 188,40 ± 2,32 * | 163,00 ± 19,26 * |
| | Glyserol | 163,76 ± 8,33 | 95,31 ± 83,99 |
| | Acetat | 133,65 ± 7,47 | 159,58 ± 17,39* |
| <i>I. galbana</i> | Foto | 74,12 ± 11,48 | 150,35 ± 0,70 |
| | Glukose | 127,03 ± 8,76* | 119,83 ± 7,91* |
| | Glyserol | 92,43 ± 11,05 | 106,82 ± 5,40* |
| | Acetat | 126,82 ± 5,54* | 72,50 ± 11,47* |

*signifikant forskjell fra fotoautotroft dyrket kultur p<0,05

4.1.3 Effekt av organiske karbonsubstrater på lipidproduktivitet

Ingen karbonsubstrater ga økt lipidproduktivitet hos *P. tricornutum* sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur (Tabell 3). Fotoautotroft dyrket kultur hadde en høyere lipidproduktivitet ($36,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) enn kulturer dyrket med tilsetning av glukose ($29,64 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), glyserol ($31,94 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) og acetat ($31,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), men produktiviteten av flerumettede fettsyrer (herunder EPA) var signifikant høyere i kultur dyrket med acetat. Produktivitet av PUFA og EPA var henholdsvis $13,56$ og $6,64 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i kultur tilsatt acetat mot $11,45$ og $5,81 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i fotoautotroft dyrket kultur.

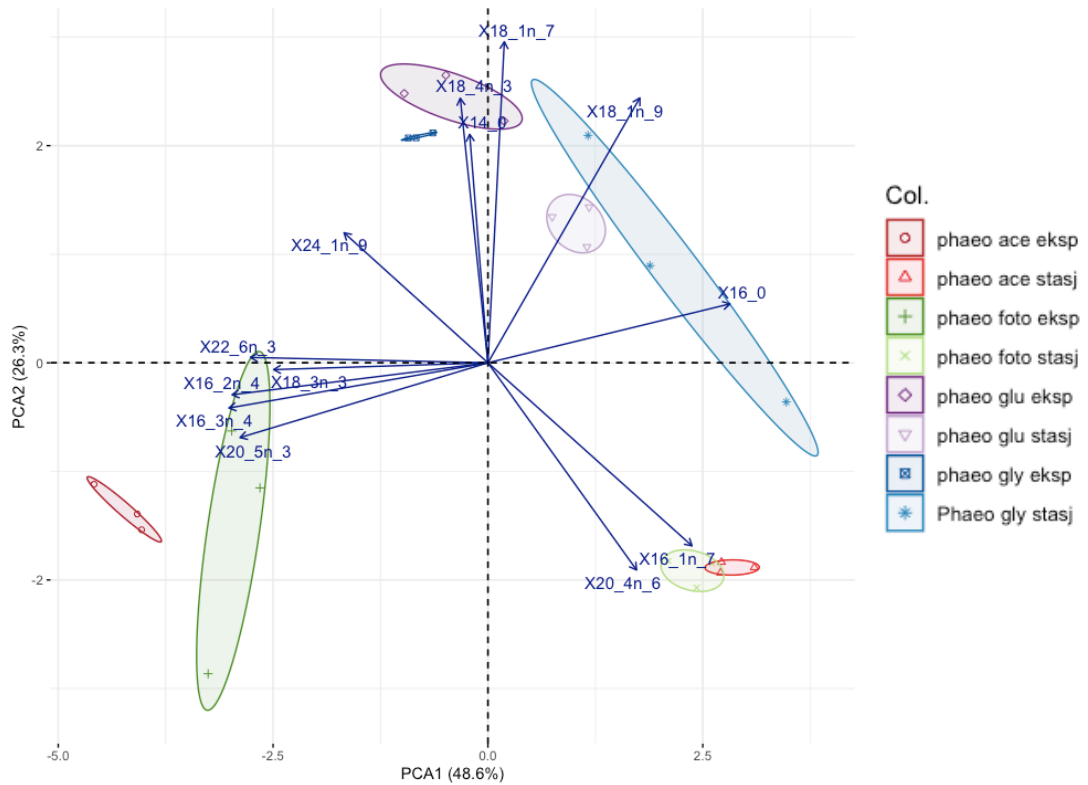
I. galbana responderte med økt lipidproduktivitet på alle karbonsubstrater sammenlignet med fotoautotrof dyrking (tabell 3). Kulturen tilsatt glukose hadde høyest lipidproduktivitet med $23,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mot $11,55 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i fotoautotrof kultur. Glukose resulterte også i høyere produktivitet av flerumettede fettsyrer og DHA med henholdsvis $8,06$ og $2,73 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mot $5,07$ og $1,67 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i fotoautotrof kultur.

Tabell 3. Lipid- produktivitet hos *P. tricornutum* og *I. galbana* ved fotoautotrof vekst og ved glukose, glyserol og acetat som organiske karbonsubstrater, med antall dager til maksimal tetthet. Verdier er basert på gjennomsnitt av biologiske triplikater og oppgitt i $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ med standardavvik (stdav).

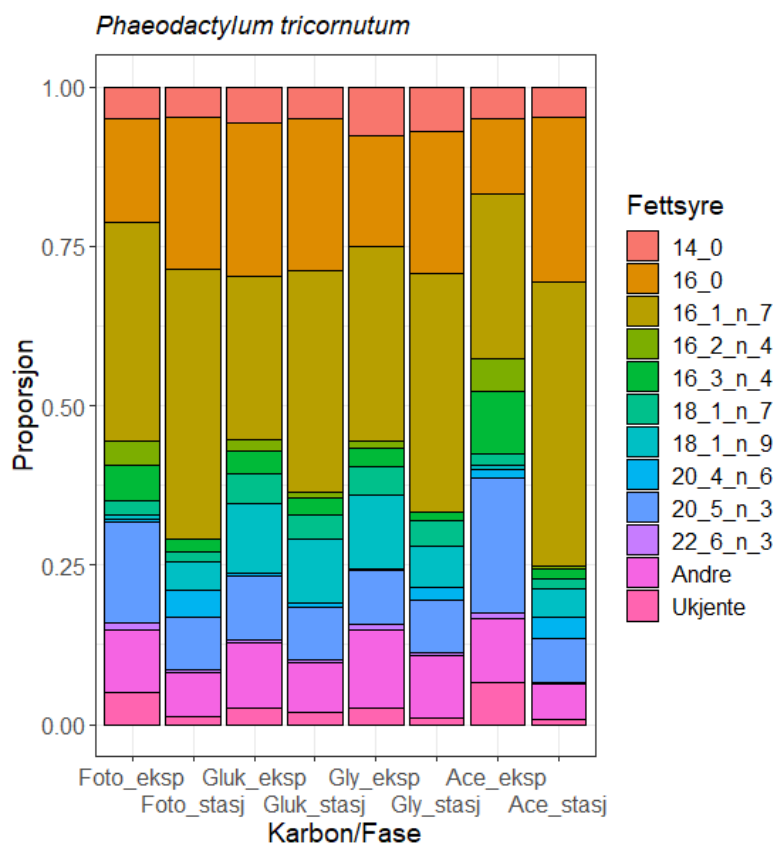
| Alge | Kultur | Antall dager til maksimal tetthet | Total FA - produktivitet $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ | SFA | MUFA | PUFA | | |
|-----------------------|----------|-----------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | | | Total | EPA | DHA |
| <i>P. tricornutum</i> | Foto | 24 | $36,95 \pm 1,42$ | $9,53 \pm 0,12$ | $14,13 \pm 0,25$ | $11,45 \pm 0,12$ | $5,81 \pm 0,01$ | $0,44 \pm 0,0$ |
| | Glukose | 11 | $29,64 \pm 3,40^*$ | $10,23 \pm 0,15^*$ | $12,90 \pm 0,05^*$ | $5,74 \pm 0,09^*$ | $2,96 \pm 0,02^*$ | $0,14 \pm 0,00^*$ |
| | Glyserol | 16 | $31,94 \pm 5,89$ | $9,75 \pm 0,05^*$ | $16,14 \pm 0,13^*$ | $5,22 \pm 0,02^*$ | $2,72 \pm 0,01^*$ | $0,27 \pm 0,00^*$ |
| | Acetat | 31 | $31,50 \pm 0,92^*$ | $6,36 \pm 0,02^*$ | $9,49 \pm 0,06^*$ | $13,56 \pm 0,09^*$ | $6,64 \pm 0,06^*$ | $0,28 \pm 0,00^*$ |
| <i>I. galbana</i> | Foto | 15 | $11,55 \pm 0,41$ | $3,72 \pm 0,04$ | $2,35 \pm 0,01$ | $5,07 \pm 0,05$ | $0,06 \pm 0,00$ | $1,67 \pm 0,0$ |
| | Glukose | 16,0 | $23,50 \pm 1,80^*$ | $8,24 \pm 0,04^*$ | $6,95 \pm 0,03^*$ | $8,06 \pm 0,06^*$ | $0,08 \pm 0,00^*$ | $2,73 \pm 0,01^*$ |
| | Glyserol | 13 | $13,20 \pm 0,73^*$ | $4,69 \pm 0,03^*$ | $4,20 \pm 0,02^*$ | $4,24 \pm 0,04^*$ | $0,16 \pm 0,00^*$ | $1,66 \pm 0,01$ |
| | Acetat | 24 | $16,92 \pm 3,64$ | $6,16 \pm 0,02^*$ | $2,03 \pm 0,0^*$ | $6,54 \pm 0,03^*$ | $0,09 \pm 0,00^*$ | $2,16 \pm 0,00^*$ |

*signifikant forskjell fra fotoautotroft dyrket kultur, $p < 0,05$.

Både PCA diagrammer (Figur 8) og søylediagrammer (Figur 9) viser at fettsyresammensetningen av *P. tricornutum* dyrket som batch-kulturer varierte både mellom eksponentiell og stasjonær fase under samme type vekstbetingelser og mellom de ulike karbonbehandlingene. Den største forskjellen i fettsyreprofil forårsaket av vekststadium (eksponentiell mot stasjonær fase) kunne observeres i kulturen dyrket med acetat. Endringene fulgte imidlertid samme mønster som det jeg observerte for kulturene som ble dyrket fotoautotroft, med økning av det prosentvise innholdet av fettsyrene 16:0, 16:1 n-7, 18:1 n-9 og 20:4 n-6 og en nedgang av 16:2 n-4, 16:3 n-4 og 20:5 n-3. Størst grad av likhet i fettsyredistribusjon mellom kultur dyrket fotoautotroft og med acetattilsetning ble observert i stasjonær fase. Fettsyreprofilene for kulturer tilsatt glukose og glyserol lignet hverandre og begge skilte seg klart fra profilene til kulturer dyrket fotoautotroft og med acetattilsetning. Endringene i profil mellom eksponentiell og stasjonær fase hos kulturene dyrket med glukose og glyserol viste seg å være mindre enn for kulturer dyrket fotoautotroft og med acetat. Størst prosentvis mengde EPA (20:5-n3) ble funnet i eksponentiell fase hos *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med acetat, henholdsvis 15,7 og 21,1%. I disse kulturene observerte jeg den største reduksjonen i EPA, hvor innhold i stasjonær fase var 8,34 og 6,84 % for henholdsvis kultur dyrket fotoautotroft og kultur tilsatt acetat. Type vekstfase spilte en mindre rolle for EPA-innhold i kulturene med glukose og glyserol som endret seg fra et innhold på henholdsvis 10,0 og 8,52 % i eksponentiell fase til 8,39 og 8,21 % i stasjonær fase.

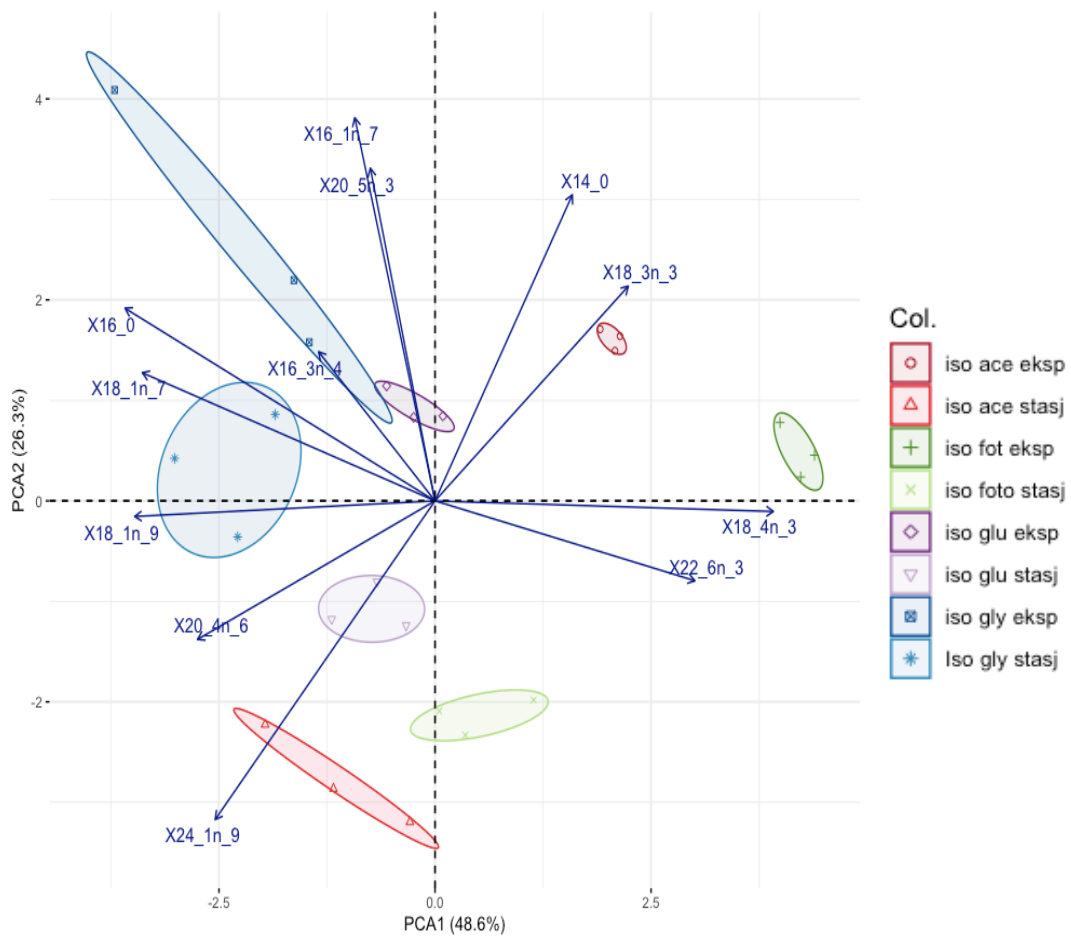


Figur 8. PCA diagram som viser grad av variasjon i fettsyreinnhold av *P. tricornutum* i eksponentiell og stasjonær fase dyrket med tilsetning av glukose, glyserol, acetat og uten tilsetning av organiske karbon. (n=3). Avstander mellom vertikal akse (PCA1) representerer en høyere variasjon enn avstander langs horisontal akse (PCA2). Tette grupperinger (små sirkler) signaliserer liten variasjon mellom triplikatenene. Nærhet mellom grupper (sirkler) av samme farge signaliserer en likhet i fettsyreprofil mellom eksponentiell og stasjonær fase. Nærhet mellom grupper av ulik farge signaliserer likhet i fettsyreprofil mellom ulik behandling.

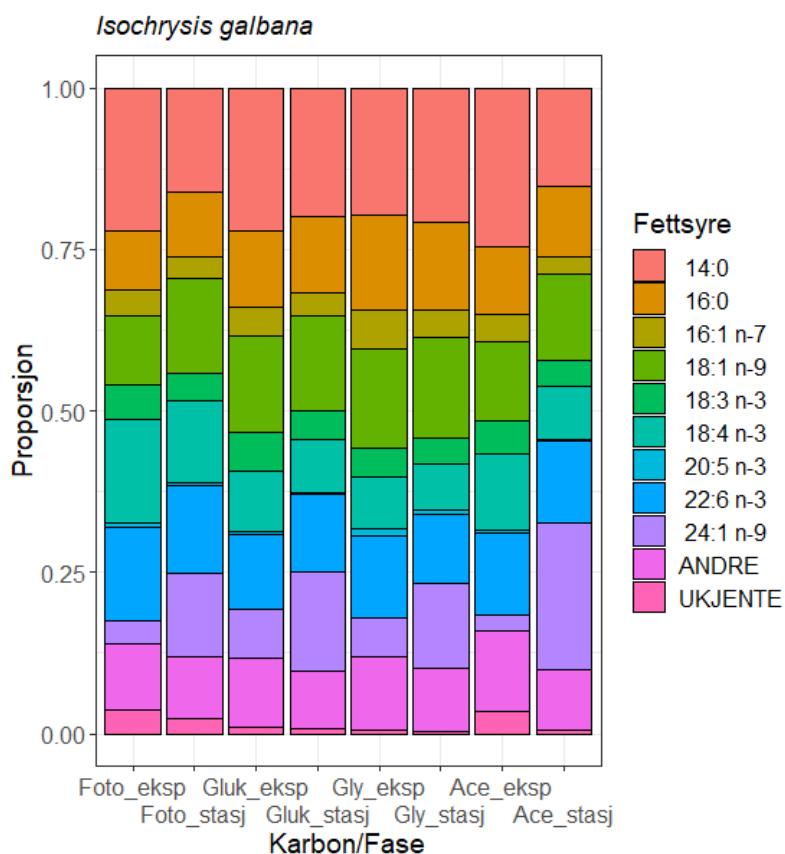


Figur 9. Fettsyrefordeling i eksponentiell og stasjonær fase i *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat. Fettsyrer med en tilstedeværelse < 4% i begge faser hos alle kulturer er samlet under «andre» med unntak av EPA (20:5n3). Ukjente fettsyrer og forgrenede alkoholer ble gitt samlebetegnelsen «ukjente».

Fettsyresammensetning av *I. galbana* varierte mellom eksponentiell og stasjonær fase i alle kulturer, men betydelig mer ved fotoautotrof dyrking og med tilskudd av acetat (Figur 10 og 11). Fettsyrefordelingen i kultur dyrket fotoautotroft viste likhetstrekk med fettsyrefordelingen i kultur tilsatt acetat både i eksponentiell og stasjonær fase. På samme måte ble det observert en høy grad av likhet i fettsyrefordelingen i kultur tilsatt glukose og kultur tilsatt glyserol i begge faser. Felles for alle kulturer var at det ble observert en økning i 24:1 n-9 og nedgang i 18:4 n-3 (Figur 10). Kulturene dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose og acetat hadde også en nedgang i 14:0. Prosentvist innhold av DHA (22:6 n-3) av totalt fettsyreinnhold var i eksponentiell fase høyest i fotoautotroft dyrket kultur (14,5%) etterfulgt av kultur dyrket med tilsetning av acetat (12,8%), glyserol (12,6%) og glukose (11,6%). Innhold av DHA endret seg ikke signifikant mellom eksponentiell og stasjonær fase i noen av kulturene.



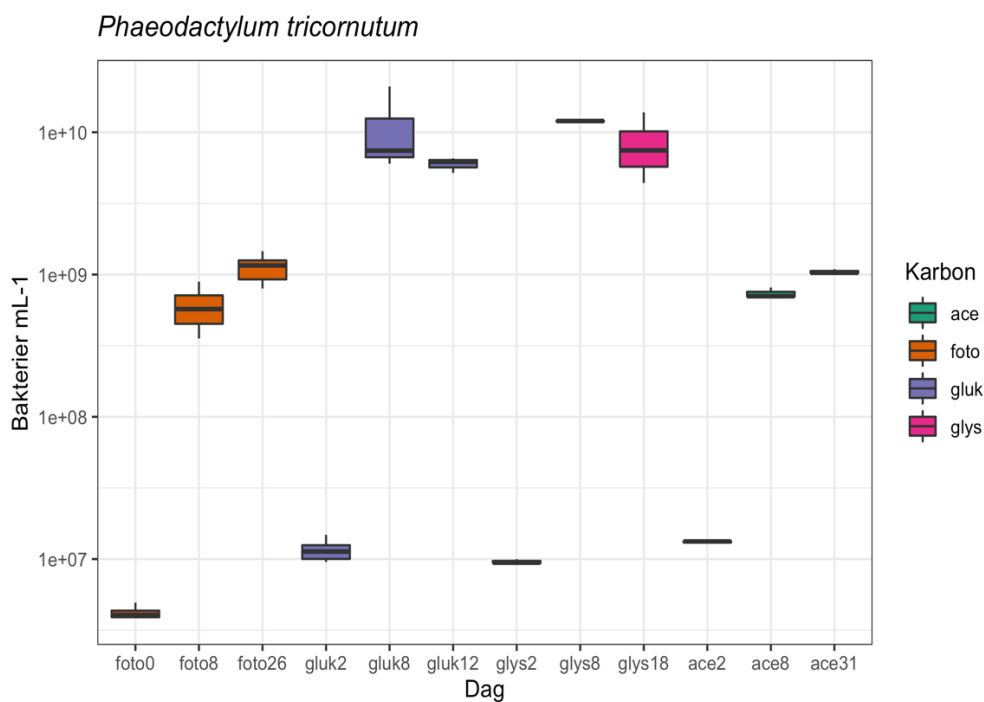
Figur 10. PCA diagram som viser grad av variasjon i fettsyreinnehold av *I. galbana* i eksponentiell og stasjonær fase dyrket med tilsetning av glukose, glyserol, acetat og uten tilsetning av organiske karbon ($n=3$). Avstander mellom vertikal akse (PCA1) representerer en høyere variasjon enn avstander langs horisontal akse (PCA2). Tette grupperinger (små sirkler) signaliserer liten variasjon mellom triplikatene. Nærhet mellom grupper (sirkler) av samme farge signaliserer en likhet i fettsyreprofil mellom eksponentiell og stasjonær fase. Nærhet mellom grupper av ulik farge signaliserer likhet i fettsyreprofil mellom ulik behandling.



Figur 11. Fettsyrefordeling i eksponentiell og stasjonær fase i *I. galbana* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat. Fettsyrer med en tilstedeværelse <4% i begge faser hos alle kulturer er samlet under «andre» med unntak av DHA (22:6n3). Ukjente fettsyrer og forgrenede alkoholer ble gitt samlebetegnelsen «ukjente».

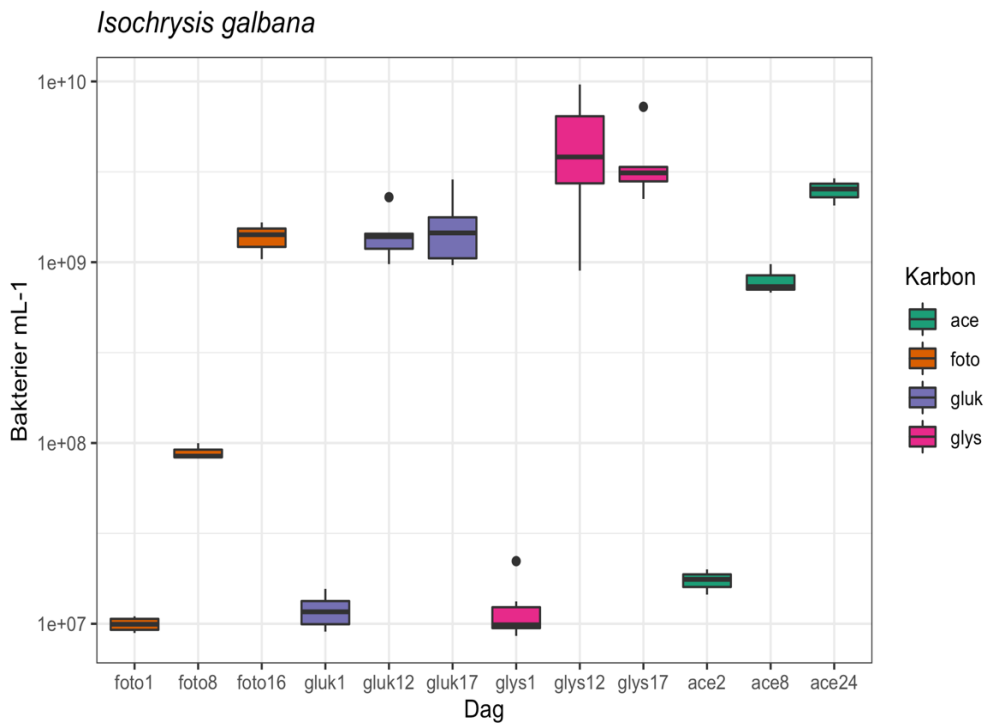
4.1.4 Bakterieinnhold

Kulturer av *P. tricornutum* dyrket med tilskudd av glukose og glyserol hadde et forholdsvis likt bakterieinnhold i alle faser, med høyest innhold i eksponentiell fase på gjennomsnittlig $1,2 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ (Figur 12). Kulturer dyrket fotoautotroft og med acetat tilsetning hadde et forholdsvis likt bakterieinnhold i alle faser, med høyest innhold i stasjonær fase på $1,1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$. Bakterietall i alle kulturer av *P. tricornutum* økte mest fra oppstart til eksponentiell fase. Fra eksponentiell til stasjonær fase var det en svak økning i kulturer dyrket fotoautotroft og med tilskudd av acetat, mens kulturer dyrket med glukose og glyserol hadde en svak reduksjon i bakterieinnhold.



Figur 12. Bakteriekoncentrasjon (antall mL⁻¹) i kulturar av *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med tilskudd av glukose, glyserol og acetat. Figuren viser forhold ved oppstart, eksponentiell og stasjonær fase for alle behandlingar og baserer seg på resultatane frå biologiske triplikatar.

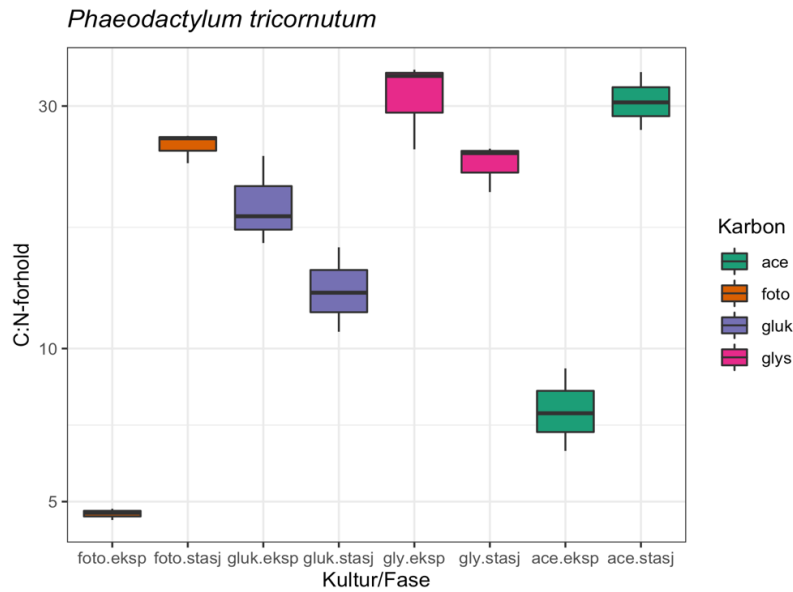
Det høyste bakteriekoncentrasjonen i kulturar av *I. galbana* observerte jeg i eksponentiell fase av kulturen dyrket med tilskudd av glyserol hvor gjennomsnittlig innhold var $4,7 \times 10^9$ mL⁻¹. (Figur 13). Bakteriekoncentrasjon i alle kulturar dyrket med tilskudd av organiske karbonsubstrater økte mest mellom oppstart og eksponentiell fase. I fotoautotroft dyrket kultur var økningen i bakteriekoncentrasjon jevnare, med størst økning mellom eksponentiell og stasjonær fase. Det høyste bakteriekoncentrasjonen i fototroft dyrket kultur var på $1,4 \times 10^9$ mL⁻¹ i stasjonær fase. I kultur dyrket med tilskudd av acetat var økningen mellom eksponentiell og stasjonær fase mindre enn i fotoautotroft dyrket kultur. Kulturen tilsatt glukose hadde et forholdsvis likt bakteriekoncentrasjon i eksponentiell og stasjonær fase, det samme gjaldt kulturen tilsatt glyserol.



Figur 13. Bakterieinnhold (mL^{-1}) i kulturer av *I. Galbana* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat. Figuren viser forhold ved oppstart, eksponentiell og stasjonær fase for alle behandlinger og baserer seg på verdier fra biologiske triplikater.

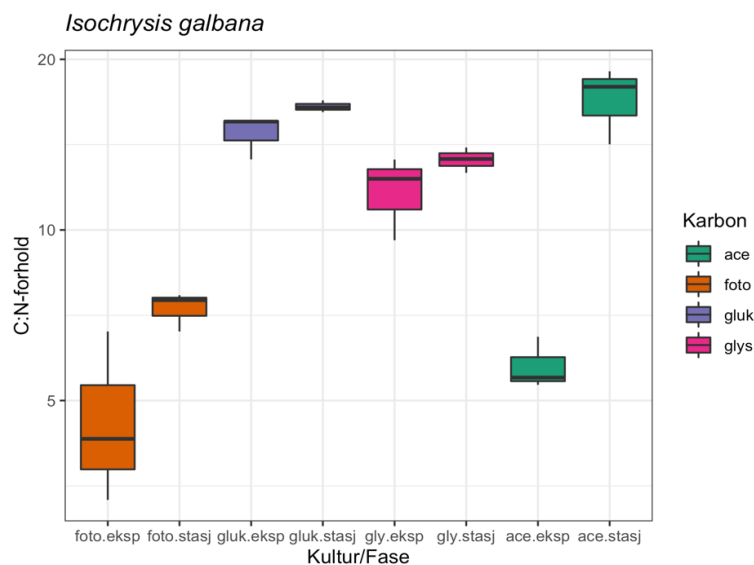
4.1.5 Karbon/Nitrogen-forhold

Gjennomsnittlig C:N-forhold i *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat var på henholdsvis 4,7, 19,4, 31,5 og 7,6 i eksponentiell fase, og 25,1, 13,2, 23,1 og 30,8 i stasjonær fase (Figur 14).



Figur 14. Forhold mellom karbon og nitrogen (C:N) i *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat. Figuren viser forhold i eksponentiell og stasjonær fase for alle behandlinger og baserer seg på resultater fra biologiske triplikater.

Gjennomsnittlig C:N-forhold i kulturer av *I. galbana* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat var på henholdsvis 4,7, 14,8, 11,7 og 5,8 i eksponentiell fase, og på 7,3, 16,5, 13,3 og 17 i stasjonær fase (Figur 15).



Figur 15. Forhold mellom karbon og nitrogen (C:N) i *I. galbana* dyrket fotoautotroft og med tilsetning av glukose, glyserol og acetat. Figuren viser forhold i eksponentiell og stasjonær fase for alle behandlinger og baserer seg på resultater fra biologiske triplikater.

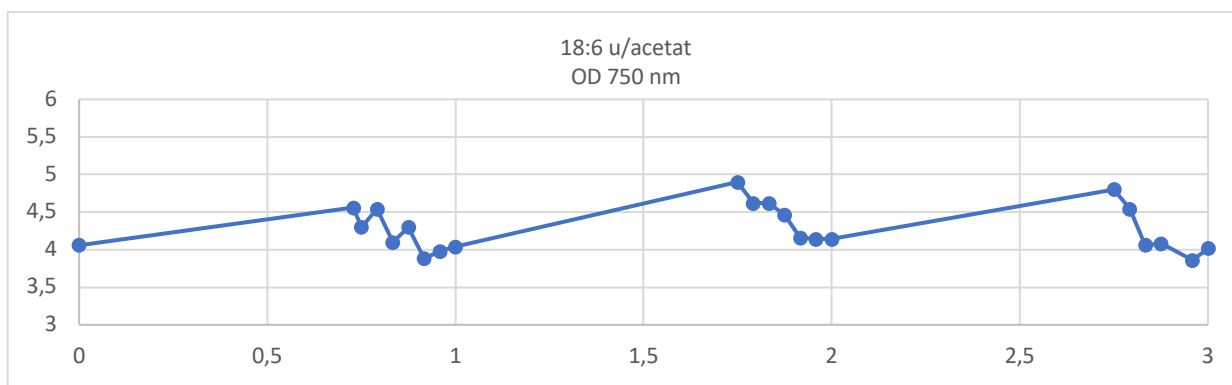
4.2 Kontinuerlig kultur

Ved forsøket utført som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor undersøkte jeg hvorvidt lys/mørke-syklus førte til signifikante forskjeller i produktivitet og fettsyreinnhold mellom kulturer dyrket med og uten acetat. Videre ville jeg finne ut om det var signifikante forskjeller i produktivitet og fettsyreinnhold mellom kultur dyrket med konstant belysning og kultur av *P. tricornutum* dyrket med lys/mørke-syklus ved dyrking med acetat. For å finne svar på dette var det avgjørende at kulturene faktisk oppnådde «steady state», med et konstant turbiditetsnivå i lysperiode med identiske forhold i kultiveringsparametere. Tetthetsmålinger gjennom det som ble ansett som «steady state» i kultur dyrket med: L/M uten acetat, L/M med acetat og kontinuerlig belysning er vist i henholdsvis figur 16, 17 og 18.

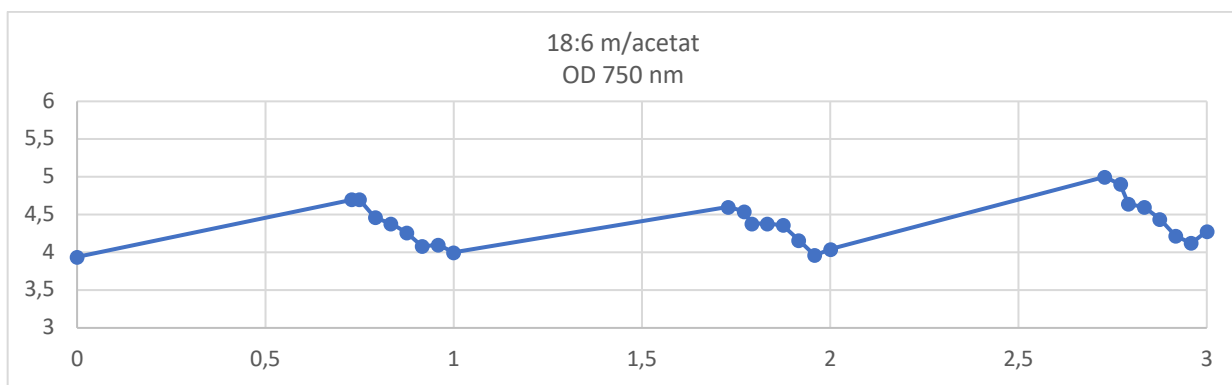
4.2.1 Vekst i kontinuerlige kulturer

Tetthetsmålingene bekreftet ikke vekst i mørket for kulturene dyrket med lys/mørke-syklus, både med og uten acetat, viste en forholdsvis lik nedgang i biomasse gjennom mørkeperioden på 6 timer (Figur 16 og 17). Tetthetsmålinger av kultur dyrket med kontinuerlig belysning viste en svak nedgang gjennom første og siste dag og en svak økning i tetthet mellom dag 1 og 2 (Figur 18).

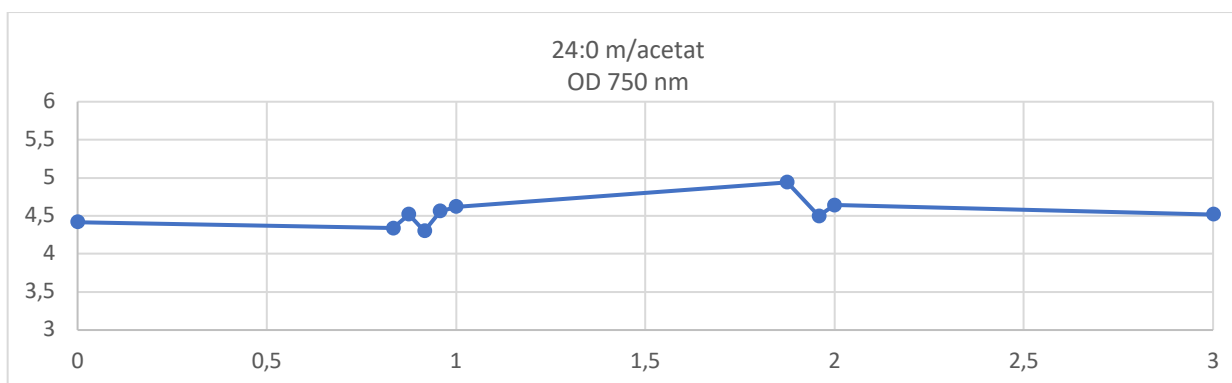
Lys/mørke syklus resulterte i høyere veksthastighet per døgn hos *P. tricornutum* både med og uten tilsetning av acetat med henholdsvis $0,91 \text{ d}^{-1}$ og $1,08 \text{ d}^{-1}$ mot $0,58 \text{ d}^{-1}$ sammenlignet med kultur dyrket med acetat og kontinuerlig belysning (tabell 4). Produktivitet per døgn hos *P. tricornutum* var signifikant forskjellig mellom forsøkene 18:6 L/M uten acetat, 18:6 L/M med acetat og 24:0 med acetat, med henholdsvis $1,18$, $0,92$ og $0,67 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (tabell 4).



Figur 16. Tetthetsmålinger ved OD 750 nm av *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur med 18:6 lys/mørke-syklus uten acetattilsetning. Grafen viser tetthet gjennom 3 dager «steady state» og punkter markerer times-målinger gjennom 6 timer mørkeperiode.



Figur 17. Tetthetsmålinger ved OD 750 nm av *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur med 18:6 lys/mørke-syklus og acetattilsetning. Grafen viser tetthet gjennom 3 dager «steady state» og punkter markerer times-målinger gjennom 6 timer mørkeperiode.



Figur 18. Tetthetsmålinger ved OD 750 nm av *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur med 24-timers belysning med acetattilsetning. Grafen viser tetthet gjennom 3 dager «steady state»

Tabell 4. Gjennomsnittlig veksthastighet (μ) og produktivitet ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) for *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor med ulik kombinasjon av lys og tilsetning av karbonsubstrat (18:6 L/M uten acetat, 18:6 L/M med acetat og 24:0 med acetat). Verdier er basert på biologiske triplikater tatt i «steady state» og oppgitt med standardavvik (stdav).

| <i>P. tricornutum</i> | | | |
|-----------------------|----------|-------------------|--|
| Lyssyklus | Kultur | Avg μ | Produktivitet $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ |
| 18:6 | u/acetat | $1,08 \pm 0,06^*$ | $1,18 \pm 0,14^*$ |
| 18:6 | m/acetat | $0,91 \pm 0,04^*$ | $0,92 \pm 0,04^*$ |
| 24:0 | m/acetat | $0,58 \pm 0,05^*$ | $0,67 \pm 0,07^*$ |

*Signifikant forskjell fra de to andre kulturforholdene, $p < 0,05$

4.2.2 Fettsyreinnhold i kontinuerlige kulturer

Totalt fettsyreinnhold per gram biomasse var høyere i kulturen dyrket med acetat under kontinuerlig belysning enn i kulturer dyrket med L/M-syklus med og uten acetat (tabell 5). Kultur dyrket med L/M-syklus og tilsetning av acetat ga et høyere totalt fettsyreinnhold enn kultur dyrket med L/M-syklus uten acetat. Uten supplering av acetat til medium var totalt fettsyreinnhold noe høyere etter 6 timer i mørket, i kulturen supplert med acetat var total mengde fettsyre lavere, men forskjellene var ikke signifikante. Kulturene dyrket med L/M-syklus hadde et signifikant lavere prosentvist innhold av mettede fettsyrer og et signifikant høyere innhold av flerumettede fettsyrer, herunder EPA, etter mørkeperioden (Tabell 5).

Tabell 5. Lipid-innhold (mg FA/g BM) og prosentvis fordeling av fettsyrer (mettede, enumettede, flerumettede og EPA) etter lysperiode og etter mørkeperiode hos *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlige kulturer i turbidostat-reaktor med ulike kombinasjoner av lys og tilsetning av karbonsubstrat (18:6 L/M uten acetat, 18:6 L/M med acetat og 24:0 L/M med acetat). EL = Etter Lys, EM = Etter Mørke, X representerer kontinuerlig lys og kun ett fast tidspunkt for prøvetaking i døgnet. Verdier er basert på biologiske triplikater tatt i «steady state» og oppgitt med standardavvik (stdav).

| <i>P. tricornutum</i> | | | | | | | |
|-----------------------|----------|-----|------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Lyssyklus | Kultur | Tid | tFA (mg FA/g BM) | FA fordeling % | | | |
| | | | | SFA | MUFA | PUFA Total | EPA |
| 18:6 | u/acetat | EL | 126,24 ± 5,47 | 29,98 ± 0,45 | 27,74 ± 0,28 | 39,54 ± 0,57 | 20,58 ± 0,39 |
| 18:6 | u/acetat | EM | 133,92 ± 1,43 | 24,62 ± 0,26* | 26,08 ± 0,24* | 44,97 ± 0,38* | 23,45 ± 0,23* |
| 18:6 | m/acetat | EL | 167,28 ± 20,46 | 30,97 ± 0,18 | 30,91 ± 0,41 | 34,91 ± 0,50 | 18,18 ± 0,38 |
| 18:6 | m/acetat | EM | 154,20 ± 5,07* | 27,13 ± 0,60* | 29,55 ± 0,92 | 39,62 ± 1,40* | 20,88 ± 0,84* |
| 24:0 | m/acetat | X | 190,76 ± 14,83 | 33,41 ± 0,91 | 35,73 ± 1,23 | 28,28 ± 1,72 | 15,41 ± 0,77 |

*signifikant forskjell fra «EL» under samme kulturforhold $p < 0,05$

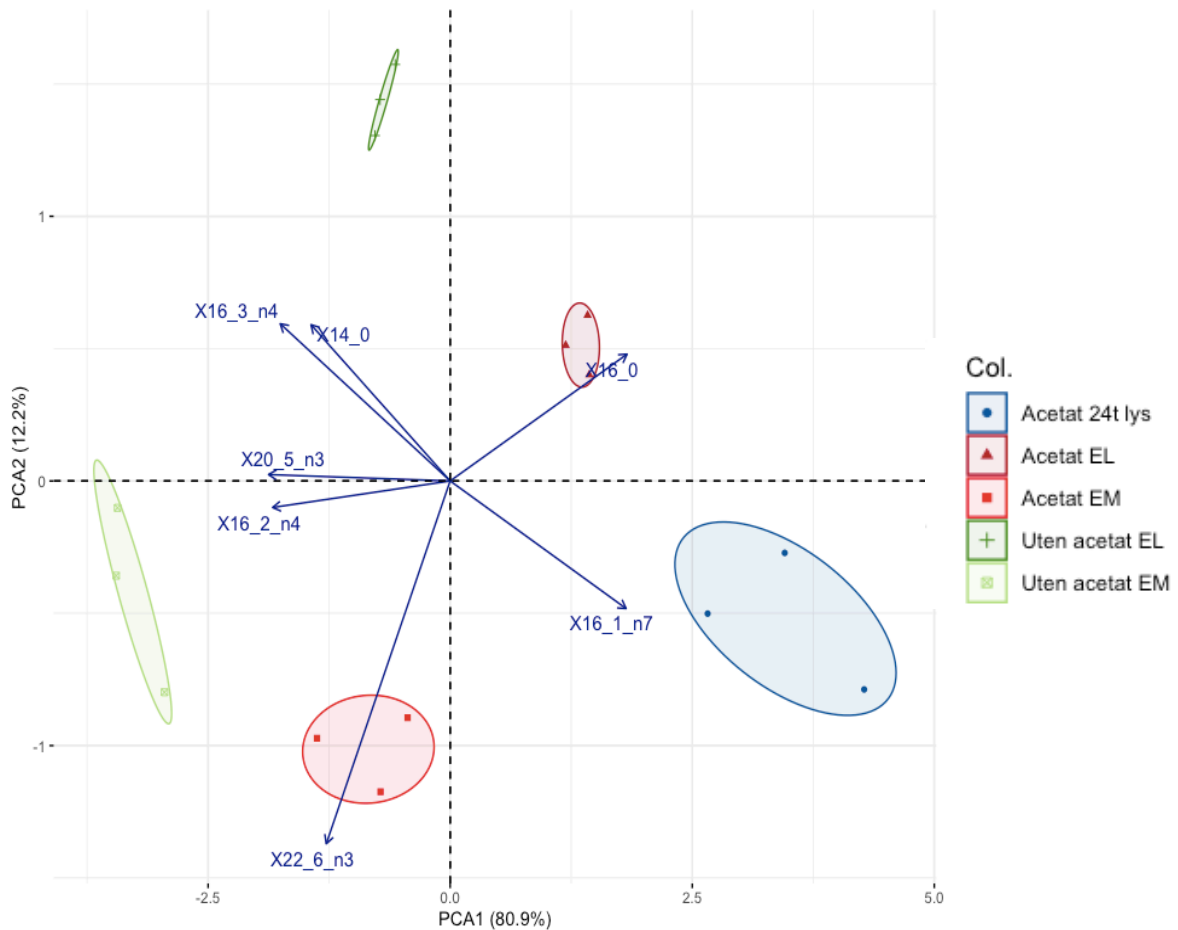
Den totale lipidproduktiviteten hos *P. tricornutum* i kontinuerlig kultur var signifikant høyere ved dyrking med L/M- syklus både med og uten tilsetning av acetat sammenlignet med kontinuerlig lys med acetattilsetning (Tabell 6). Konstant lys førte til høyere produksjon av mettede og en-umettede fettsyrer og signifikant lavere produksjon av flerumettede fettsyrer enn hos kulturer dyrket med L/M-syklus. Høyest produktivitet av EPA ble oppnådd gjennom 18:6 L/M- syklus uten tilsetning av acetat. L/M- syklus stimulerte også til høyere produksjon av DHA hos *P. tricornutum* både med og uten acetat tilsatt, sammenlignet med kultur dyrket med kontinuerlig belysning.

Tabell 6. Lipidproduktivitet for *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor med ulik kombinasjon av lys og tilsetning av karbonsubstrat (18:6 L/M uten acetat, 18:6 L/M med acetat og 24:0 L/M med acetat). Verdier er basert på triplikater (prøvetaking på samme tidspunkt over en periode på 3 sammenhengende dager i «steady state») og oppgitt som mg L⁻¹ d⁻¹ med standardavvik (stdav).

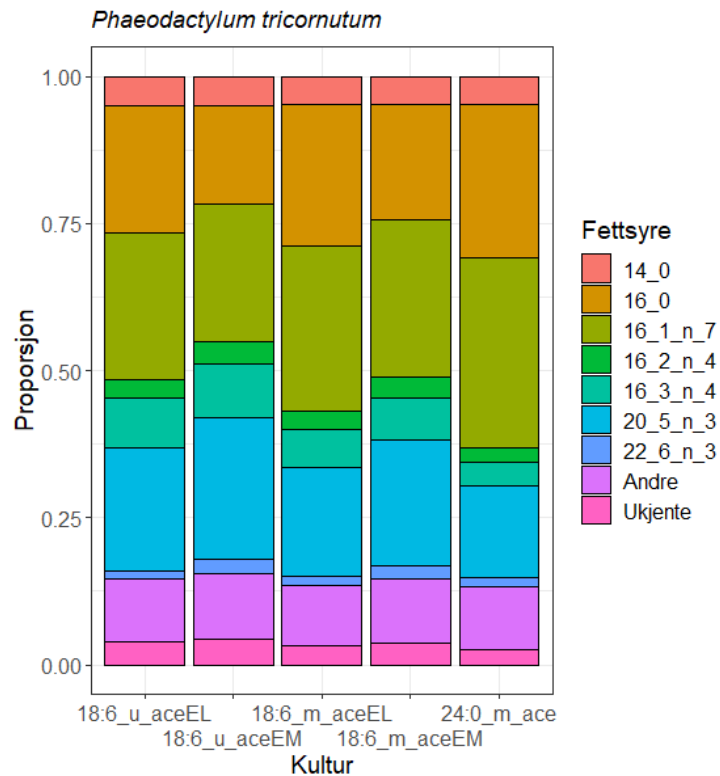
| <i>P. tricornutum</i> | | | | | | | |
|-----------------------|----------|--|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| Lyssyklus | Kultur | Total FA mg L ⁻¹ d ⁻¹ | Mettede | MUFA | PUFA | | |
| | | | | | Total | EPA | DHA |
| 18:6 | u/acetat | 158,68 ± 18,58 | 39,06 ± 4,57 | 41,28 ± 4,84 | 71,36 ± 8,36* | 37,22 ± 4,26* | 3,65 ± 0,43* |
| 18:6 | m/acetat | 142,47 ± 5,72 | 38,65 ± 1,55 | 42,10 ± 1,69 | 56,45 ± 2,27* | 29,75 ± 1,19* | 3,05 ± 0,12* |
| 24:0 | m/acetat | 129,87 ± 14,72* | 43,39 ± 4,92 | 46,41 ± 5,27 | 36,72 ± 4,17* | 20,01 ± 2,27* | 2,09 ± 0,24* |

*Signifikant forskjell fra de to andre kulturforholdene, p < 0,05

PCA analyse viste at fettsyreprofilen i *P. tricornutum* varierte mellom de tre forsøkene (Figur 19). Forskjellen i fettsyreprofilen mellom dyrking med L/M-syklus uten tilsetning av acetat og dyrking med L/M-syklus med tilsetning av acetat, skyldtes hovedsakelig fettsyrene 16:3 n-4 og 20:5 n-3 som det var et høyere innhold av i kultur dyrket uten acetat, samt 16:0 og 16:1 n-7 som det var et høyere innhold av i kultur dyrket med tilsetning av acetat. (Figur 19 og 20). Fettsyreprofilen i *P. tricornutum* dyrket med kontinuerlig belysning og tilsetning av acetat skiller seg ut hovedsakelig på grunn av et høyere innhold av fettsyrene 16:0 og 16:1 n-7 og et lavere innhold av 20:5-n3 enn ved dyrking med L/M-syklus. En forskjell mellom fettsyreprofilen i *P. tricornutum* før og etter mørkeperiode ble observert i kultur både med og uten tilsetning av acetat, i form av en høyere andel flerumettede fettsyrer etter mørkeperiode. Ulikheten i fettsyreprofil før og etter mørkeperiode var i størst grad forårsaket av fettsyrene 16:0, som det var en høyere andel av etter lys, og av 20:5 n-3 og 22:6n3 som det var høyere andel av etter mørke.



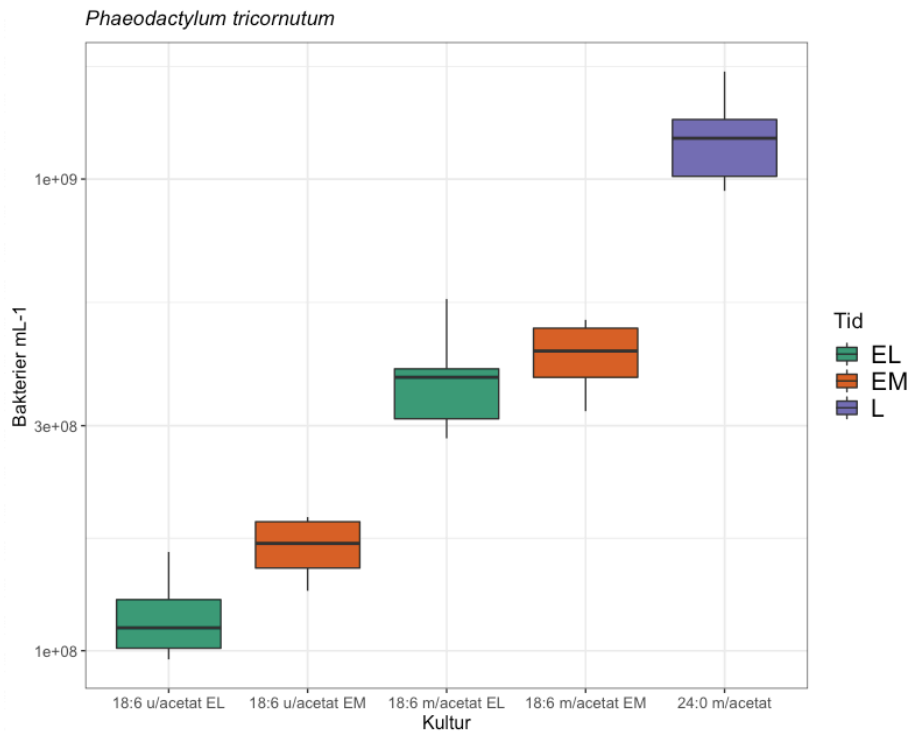
Figur 19. PCA diagram som viser grad av variasjon i fettsyreinnehold av *P. tricornutum* dyrket i kontinuerlig kultur med BLÅ = 24:0 m/acetat, RØD: 18:6 m/acetat (firkant og lysere rød = etter mørkeperiode, trekant og mørkere rød = etter mørkeperiode), GRØNN: 18:6 u/acetat (plusstegn og mørkere grønn = før mørkeperiode, firkant og lysere grønn = etter mørkeperiode). Basert på prosentvis fordeling av fettsyrer med en tilstedeværelse >3%. Prøver er basert på triplikater (prøvetaking på samme tidspunkt over en periode på 3 sammenhengende dager i «steady state»). Avstander mellom vertikal akse (PCA1) representerer en høyere variasjon enn avstander langs horisontal akse (PCA2). Tette grupperinger (små sirkler) signaliserer liten variasjon mellom triplikatene. Nærhet mellom grupper (sirkler) av samme farge signaliserer en likhet i fettsyreprofil mellom eksponentiell og stasjonær fase. Nærhet mellom grupper av ulik farge signaliserer likhet i fettsyreprofil mellom ulike behandlinger.



Figur 20. Fettsyrefordeling i *P. tricornutum*. Basert på prøver tatt i «steady state» for fotoperiodiske forsøk med og uten acetat og konstant belysning med acetat. Fettsyrer med en tilstedeværelse < 3% i samtlige kulturer er samlet under «andre» med unntak av DHA (22:6n3). Ukjente fettsyrer og forgrenede alkoholer ble gitt samlebetegnelsen «ukjente». «EL» representerer Etter Lys, «EM» representerer Etter Mørke. (n=3).

4.2.3 Bakterieinnhold i kontinuerlige kulturer

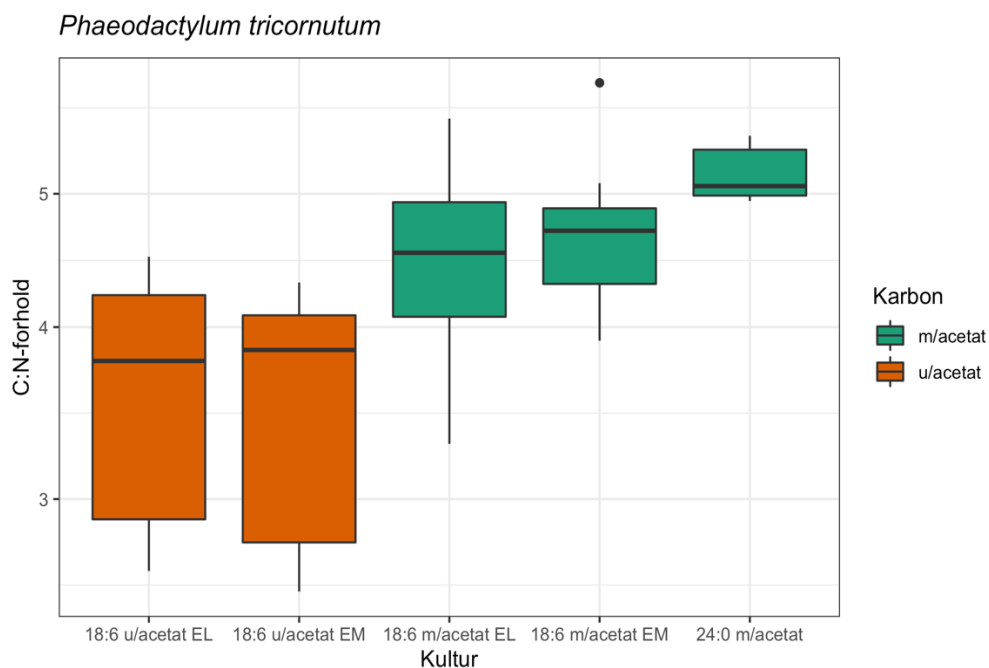
Bakterieinnhold i kontinuerlig kultur av *P. tricornutum* økte signifikant mellom de tre forsøkene (Figur 21). Et høyere bakterieinnhold ble observert etter mørkesyklus i forsøk både med og uten tilsetning av acetat. Gjennomsnittlig bakterieinnhold i kulturen var omlag 10 ganger høyere gjennom forsøket med kontinuerlig belysning og acetattilsetning enn i forsøket med L/M-syklus uten acetat, med et gjennomsnittlig innhold på henholdsvis $1,2 \times 10^9$ og $1,3 \times 10^8$ bakterier ml^{-1} .



Figur 21. Bakterieinnhold i *P. tricornutum* dyrket med 18:6 lys/mørke-syklus uten acetat, 18:6 lys/mørke-syklus med acetat tilsatt og 24:0 lys/mørke-syklus med acetat tilsatt. Figuren viser innhold før (EL) og etter (EM) mørke-periode for de to behandlingene med L/M-syklus og kontinuerlig belysning (L). Verdier er basert på triplikater (prøvetaking på samme tidspunkt over en periode på 3 sammenhengende dager i «steady state») og er oppgitt i antall mL⁻¹.

4.2.4 Karbon/nitrogen-forhold i kontinuerlige kulturer

Gjennomsnittlig C:N-forhold i kulturen ved dyrking med 18:6 L/M-syklus uten acetat var på 3,7 før mørkeperiode og 3,6 etter mørkeperiode (Figur 22). Ved dyrking med 18:6 L/M-syklus med acetat var C:N-forhold 4,6 før mørkeperiode og 4,7 etter mørkeperiode. Ved kontinuerlig belysning og acetattilsetning hadde kulturen et gjennomsnittlig C:N-forhold på 5,2.



Figur 22. Forhold mellom karbon og nitrogen (C:N) i *P. tricornutum* dyrket med 18:6 lys/mørke-syklus uten acetat, 18:6 lys/mørke-syklus med acetat tilsatt og 24:0 lys/mørke-syklus med acetat tilsatt. Figuren viser fordeling før og etter mørke-periode for kulturer dyrket med L/M syklus og kultur dyrket med kontinuerlig belysning. Resultater er basert på biologiske triplikater.

4.2.5 Morfologi

Mørkesyklus så ikke ut til å påvirke fordelingen av de tre morfologiske celleformene ved dyrking uten acetat (Tabell 7). Ved dyrking med L/M-syklus og acetattilsetning ble det observert flere fusiforme og færre ovale celler etter mørketid, men forskjellene var ikke statistisk signifikante ($p > 0,05$).

Tabell 7. Prosentvis fordeling av celleform av *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur med 1) 18:6 lys/mørke-syklus uten acetat tilsatt 2) 18/6 lys/mørke-syklus med acetat tilsatt og 3) 24 timers belysning med acetat tilsatt. EL = Etter Lys, EM = Etter mørke. Verdier er basert på biologiske triplikater og oppgitt med standardavvik (stdav) (n=3).

| | % fusiforme | | % ovale | | % triradiate | |
|----------------------|-------------|------------|------------|------------|--------------|-----------|
| | EL | EM | EL | EM | EL | EM |
| 18:6 u/acetat | 64,1 (1,4) | 63,4 (7,9) | 34,7 (1,8) | 35,1 (6,7) | 0,5 (0,5) | 1,9 (1,1) |
| 18/6 m/acetat | 61,6 (6,9) | 74,7 (4,7) | 36,9 (7,0) | 21,2 (4,1) | 0 | 0,1 (0,2) |
| 24:0 m/acetat | 71,9 (4,4) | - | 26,2 (4,7) | - | 1,9 (1,3) | - |

5 Diskusjon

5.1 Batch-forsøk

Ingen av de organiske karbonsubstratene førte til økt biomasseproduktivitet av *P. tricornutum* sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur. For *I. galbana* derimot førte både glukose og acetat til signifikant økning. En signifikant økning i lipidinnhold ble observert hos *P. tricornutum* i kulturer dyrket med glukose og glyserol, glukose og acetat hadde den samme effekten på *I. galbana*. For begge alger ble det observert en høy grad av likhet i fettsyreprofil mellom kulturer dyrket med glukose og glyserol og mellom kulturer dyrket fotoautotroft og med tilskudd av acetat. For begge alger ble det observert en lengre periode med vekst før stasjonær fase for kulturer dyrket med tilskudd av acetat, sammenlignet med kulturer dyrket fotoautotroft. Fotoautotroft dyrkede kulturer og kulturer med tilskudd av acetat oppnådde en høyere biomassetetthet og høyere innhold av flerumettede fettsyrer sammenlignet med kulturer tilsatt glukose og glyserol. Ut fra denne oppsummeringen kan det virke som acetat er det beste karbonsubstratet for miksotrof dyrking av *P. tricornutum* og *I. galbana* med produksjon av flerumettede fettsyrer som formål. To helt sentrale faktorer gjør det likevel vanskelig å vurdere den egentlige effekten av glukose og glyserol: Tidspunkt for prøvetaking og bakterieinnhold. Det er sentralt å diskutere disse faktorene før en nærmere diskusjon rundt effekten av karbonkildene.

Prøvetaking til fettsyreanalyser i eksponentiell fase ble gjort samme dag for alle kulturer av *P. tricornutum*. For *I. galbana* ble prøvetaking gjort 4 dager senere for kulturer tilsatt glukose og glyserol enn for kulturer dyrket fotoautotroft og med acetattilskudd. Det vil med andre ord si at kulturer av begge alger dyrket med glukose og glyserol var nærmere sin stasjonære fase enn fotoautotroft dyrket kultur og kultur med acetat. Når algene går inn i stasjonær fase er veksten begrenset av en eller flere sentrale variabler, f.eks. mangel på næringsstoffer. Ettersom energi algene høster overstiger energibehovet for celledeling og vedlikehold vil mer energi bli lagret, i hovedsak som mettede og enumettede fettsyrer, mens innhold av flerumettede fettsyrer synker fordi mindre investeres i membranlipider (Dunstan et al., 1993; Eizadora et al., 2009; Prestegard et al., 2016; Zhu et al., 1997). Hos både *I. galbana* og *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft og med tilskudd av acetat ble det observert en slik utvikling, lipidfordelingen i kulturene tilsatt glukose og glyserol derimot, viste ikke like store forskjeller i fordeling av lipidklassene mellom fasene. Dette indikerer at prøvetaking ble gjort for sent og

derfor ikke representerer fettysyreinnhold og distribusjon i den faktiske eksponentielle fasen. En årsak til tidligere overgang til stasjonær fase i kulturene tilsatt glukose og glyserol kan være at vekst ble hindret gjennom tilstedeværelse av bakterier. Måling av bakterier i batch-kulturer av *I. galbana* og *P. tricornutum* viste at antallet steg raskt fra starten av eksperimentet til eksponentiell fase. En slik utvikling ble observert i alle kulturer, men i størst grad i kulturene tilsatt glukose og glyserol. Dette var ikke en helt uventet observasjon ettersom heterotrofe bakterier vokser raskt ved tilgang på enkle karbonsubstrater, og i dette prosjektet ble det tilsatt større mengder av glukose og glyserol enn acetat. Heterotrofe bakterier vil konkurrere med algene om næringsstoffer i mediet og samtidig bidra med avfallsstoffer til kulturen. Det er nærliggende å anta at disse faktorene bidro til en kortere periode med vekst frem til stasjonær fase for kulturene dyrket med glukose og glyserol. Deschênes (2016) viser gjennom matematiske modeller for vekst og næringskonsum for alger og bakterier at heterotrofe bakterier raskt vil kunne utkonkurrere alger i miksotrofe kulturer ved næringsoverskudd. Han viser også at gradvis tilsetning av organisk karbon vil kunne begrense bakterievekst uten å begrense vekst av algene i særlig grad. Flere studier konkluderer med at glukose og glyserol er karbonsubstrater som vil øke vekst av *I. galbana* og *P. tricornutum* vesentlig mer enn det jeg observerte gjennom mine forsøk (Alkhamis & Qin, 2013; Ceron Garcia et al., 2006; Villanova et al., 2017). En årsak til at dette ikke skjedde i mine forsøk kan være at ettersom bakterieinnholdet i kulturene var høyt i utgangspunktet, kan det ha medført at bakteriene utkonkurrerte algene fordi de i større grad dro nytte av det organiske karbonsubstratet. Det kan også være at strategien jeg benyttet for tilsetning av organiske karbonsubstrater ikke var optimal og heller burde blitt gjort over et lengre tidsrom med mindre tilsetningsvolum for å fremme vekst av algene og begrense bakterieinnhold.

5.1.1 Effekt av organiske karbonsubstrater på vekst og fettysyreinnhold av *P. tricornutum*

Glukose viste ikke noen effekt på maksimal vekstrate av *P. tricornutum* og resulterte i signifikant lavere produktivitet enn fotoautotroft dyrket kultur, noe som kan antyde at *P. tricornutum* ikke har evne til å assimilere dette karbonsubstratet. Det er rapportert svært ulike resultater når det kommer til effekt av glukose på vekst av *P. tricornutum*. Zheng et al. (2013) fastslo at glukose førte til høyere vekstrate av *P. tricornutum*. Huang et al. (2015) fant ikke noen effekt av glukose på vekstrate, men ved bruk av genomsekvensering oppdaget de at det aktuelle isolatet mangler glukose permease, et enzym som katalyserer fosforylering av

glukose og utgjør det første trinnet i glykolysen. De tror derfor at genetisk ulikhet mellom isolater kan være årsak til ulik effekt av glukose på vekst av *P. tricornutum*. På bakgrunn av lav maksimal veksthastighet og produktivitet i mitt forsøk kunne det vært interessant å finne ut om glukose permease er tilstede hos *P. tricornutum* B58, som var isolatet benyttet i dette prosjektet. Det som skilte seg ut i glukosetilsatt kultur var det høye fettsyreinnholdet, som var dominert av mettede og enumettede fettsyrer. Hvorvidt dette er et direkte resultat av glukose gjennom opptak, eller om det er et resultat av sub-optimale kulturforhold er ikke mulig å fastslå med sikkerhet på bakgrunn av resultatene fra dette forsøket. På bakgrunn av det høye bakterieinnholdet er det likevel grunnlag for å tro at algene responderte med å lagre fettsyrer fremfor å investere energi i vekst, da kulturforholdene trolig ikke var optimale. En observasjon som likevel tyder på en assimilering av glukose er det høye karboninnholdet som skilte seg signifikant fra fotoautotroft dyrket kultur. Både utvikling i C:N-forhold og fettsyreprofil i glukosetilsatt kultur viste høy grad av likhet med kultur dyrket med tilskudd av glyserol, noe som kan tyde på en likhet i flere metabolske responser på de to karbonsubstratene hos *P. tricornutum*.

Det er bred enighet om at *P. tricornutum* kan assimilere glyserol (García et al., 2000; Garcia et al., 2005; Huang et al., 2015). Villanova et al. (2017) viste at glyserol førte til økt lipidsyntese og dobling av biomasseproduktivitet og at sentrale metabolske sykluser ble påvirket av glyserol. De fant at fotosyntetisk aktivitet i liten grad ble redusert, mens andre sentrale metabolske prosesser som respirasjon, Krebs syklus, glykolyse og syntese av lipider og karbohydrater ble oppregulert. I mitt forsøk så jeg ikke den samme graden av produktivitetsøkning, men maksimal veksthastighet og innhold av karbon og mettede og enumettede fettsyrer var betydelig høyere i glyseroltilsatt kultur sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur, noe som kan bety at både lipidsyntese og karbohydratsyntese ble stimulert av glyserol. I likhet med hva som ble observert i kultur tilsatt glukose var bakterieveksten høy og antas å ha hindret vekst av *P. tricornutum*, samt at det kan ha utgjort en stressfaktor som medførte økt lipidakkumulering.

Huang et al. (2015) fant at acetat fremmet vekst av *P. tricornutum* ved overskudd av nitrogen, men at acetat hemmet vekst ved nitrogenunderskudd. De observerte heller ikke forskjeller i totalt lipidinnhold ved tilskudd av acetat. Mus et al. (2013) konkluderte derimot med at acetat ikke hadde effekt på vekstraten av *P. tricornutum*, men derimot økte lipidakkumulering 4-6 ganger. Mine resultater samsvarer med observasjonene til Huang et al. (2015), da kultur tilsatt

acetat hadde en høyere maksimal vekstrate, men ikke et høyere lipidinnhold i eksponentiell fase sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur. At det rapporteres om motstridende observasjoner av effekten acetat har på *P. tricornutum* kan kanskje skyldes at karbonmetabolismen for acetat varierer mellom forskjellige, slik Huang et al. (2015) gjennom sitt forsøk demonstrerte er tilfelle for glukose.

Fettsyreprofilene mellom fotoautotrof kultur og kulturene tilsatt organiske karbonsubstrater viste klare forskjeller. En økt grad av mettede og enumettede fettsyrer var en klar tendens i kulturene tilsatt glukose og glyserol sammenlignet med fotoautotrof kultur, begge karbonsubstrater resulterte i betydelig lavere innhold av EPA. Dette strider mot resultater fra annen forskning som har funnet at glyserol fører til betydelig økning i EPA-fraksjonen av lipider i *P. tricornutum*, mens glukose ikke fører til en signifikant endring sammenlignet med fotoautotrof dyrking (Ceron Garcia et al., 2006; Garcí et al., 2000; Patel et al., 2019). Hamilton et al. (2014) fant at de dominerende fettsyrene i stasjonær fase er 16:0, 16:1 n-7, 18:1 n-9 og 20:5 n-3. De samme fettsyrene var dominerende i stasjonær fase av alle *P. tricornutum*-kulturer i dette forsøket, men disse fettsyrene var også dominerende i eksponentiell fase av kulturene dyrket med glukose og glyserol. Dette styrker mistanken om at prøvetaking ble gjort for sent og at resultatene for disse to kulturene ikke er representative for faktisk eksponentiell fase. En alternativ forklaring til resultatene kan være at konsentrasjon av organisk karbon var årsaken. Overskudd av flere substrater, herunder sukker, kan øke lipidinnhold og graden av mettede fettsyrer og redusere vekst og innhold av membranlipider (Liu et al., 2014; Wood, 1988). Villanova et al. (2017) peker på at når det kommer til fettsyresyntese har *P. tricornutum* sin respons til glyserol store likhetstrekk med responsen sett ved nitrogenunderskudd, hvor det akkumuleres TAG og mettede og enumettede fettsyrer (Remmers et al., 2017). Kultur dyrket med acetat hadde en signifikant høyere andel EPA og andre flerumettede fettsyrer enn fotoautotroft dyrket kultur, noe som sammen med signifikant høyere maksimal vekstrate indikerer at acetat ble assimilert i *P. tricornutum* og stimulerte til forlengelse og av-metning av fettsyrer.

5.1.2. Effekt av organiske karbonsubstrater på vekst og fettsyreinnhold av *Isochrysis galbana*

For *I. galbana* var det kun glukose som førte til høyere produktivitet enn fotoautotroft dyrket kultur. Dette står i kontrast til resultatene fra et forsøk av Alkhamis & Qin (2013) som konkluderte med at glyserol er det mest lovende organiske karbonsubstratet for vekst av *I. galbana* ved miksotrof kultivering. De observerte høyest produktivitet ved tilskudd av 0,05 M glyserol ved $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ og at veksten i kultur supplert med glyserol ble inhibert ved lysstyrker fra $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vekst av fotoautotroft dyrket kultur ble imidlertid ikke inhibert før ved $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Glyserol førte i mitt forsøk til lavere produktivitet sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur og lavest lipidproduktivitet av de tre organiske karbonsubstratene. Et spørsmål som melder seg når mine observasjoner sammenlignes med observasjonene til Alkhamis & Qin (2013), er hvorvidt lysstyrken jeg benyttet i mitt forsøk ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kan ha inhibert vekst i den glyseroltilsatte kulturen av *I. galbana*. Lysinhiberende effekt på vekst er observert ved miksotrof kultivering av flere andre mikroager (Ogawa & Aiba, 1981; Xiao et al., 2020). Alkhamis & Qin (2013) undersøkte også miksotrof vekst av *I. galbana* med 0,012 M acetat og 0,012 M glukose som organiske karbonkilder, og de konkluderte at *I. galbana* ikke kunne assimilere acetat og at glukose kun i liten grad fremmet vekst. Resultatene til Alkhamis & Qin (2013) strider igjen med observasjonene fra dette prosjektet, hvor 0,01 M acetat ikke inhiberte vekst, men derimot førte til signifikant høyere maksimal veksthastighet, biomassetetthet og fettsyreinnhold sammenlignet med fotoautotroft dyrket kultur. En sentral forskjell var at det i Alkhamis & Qin (2013) sitt forsøk ble tilført lys med en styrke på $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mens kulturene i dette prosjektet ble dyrket ved $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dette overraskende funnet reiser spørsmål rundt hvorvidt *I. galbana* klarer å ta opp og benytte acetat først ved høyere lysstyrker. En lignende synergistisk effekt mellom lysstyrke og karbonassimilering ble av Pang & Chen (2017) observert for *Haematococcus pluvalis*, hvor assimilering av ribose økte med økende lysstyrke. En eventuell forklaring kan være at evne til assimilering av organiske karbonkilder varierer mellom kulturer av *I. galbana*, slik Huang et al. (2015) viste var tilfelle for *P. tricornutum*.

I. galbana responderte med økt lipid-produktivitet på alle karbonsubstrater, aller mest i kulturen tilsatt glukose hvor lipid-produktiviteten var over dobbelt så høy som i fotoautotroft dyrket kultur. Disse observasjonene samsvarer med resultatene fra et forsøk av Babuskin et al. (2014) som fant at glukose, glyserol og melasse økte lipidproduktivitet i *I. galbana* og at glukose i størst grad økte lipidproduktiviteten. De observerte at miksotrof kultivering økte

andelen mettede og enumettede fettsyrer, noe jeg også fant å være tilfelle for alle kulturer dyrket med tilsetning av organiske karbonsubstrater. Kun glukose og acetat ga en høyere produktivitet av flerumettede fettsyrer og DHA. Glycerol resulterte i dette forsøket i lavere biomasse-produktivitet, ingen økning i maksimal veksthastighet og et lavere innhold av flerumettede fettsyrer og fremstår derfor ikke som et aktuelt karbonsubstrat for mikсотrof kultivering av *I. galbana*. Fettsyresammensetning i *I. galbana* varierte noe mellom eksponentiell og stasjonær fase i alle kulturer, mest ved fotoautotrof dyrking og med tilskudd av acetat. Det er sannsynlig at årsaken til den mindre graden av ulikhet i fettsyreprofil av kulturer dyrket med glukose og glyserol skyldes at prøvetaking for eksponentiell fase ble tatt nærmere disse kulturenes stasjonære fase.

5.1.3 Karbon og Nitrogen innhold

Elementanalyser av biomassen til både *P. tricornutum* og *I. galbana* i eksponentiell fase dyrket med tilskudd av glukose og glyserol viste svært høye nivåer av karbon (Vedlegg B.2) og derfor et høyt C:N-forhold. For *P. tricornutum* var C:N-forhold høyere i eksponentiell enn i stasjonær fase, noe som var uventet ettersom C:N-forhold vanligvis øker med avtagende veksthastighet (Hillebrand & Sommer, 1999). Det at begge alger i eksponentiell fase viste et høyt innhold av karbon i kulturene tilsatt glukose og glyserol skyldes nettopp at medium i disse var tilsatt et høyere innhold av karbon (henholdsvis 9,01 g/L og 9,21 g/L for *P. tricornutum* og 3,6 og 4,6 g/L for *I. galbana*) enn acetat-supplert medium (0,41 g/L for *P. tricornutum* og 0,82 g/L for *I. galbana*). Algene har derfor hatt mulighet for umiddelbart opptak av organisk karbon og samtidig fiksering av CO₂, mens algecellenes karboninnhold i fotoautotroft dyrket kultur og i kultur tilsatt acetat i større grad stammer fra fiksert CO₂. Det forklarer likevel ikke hvorfor *P. tricornutum* viste en nedgang i karbon-innhold fra eksponentiell til stasjonær fase, en endring jeg ikke observerte hos *I. galbana*. Nedgangen tyder på at det foregikk en større grad av respirasjon enn fotosyntese i kulturer av *P. tricornutum* tilsatt glukose og glyserol og at det organiske karbonet i mediumet var brukt opp i stasjonær fase. Fettsyreinhold i glukosetilsatt kultur var lavere i stasjonær fase enn i eksponentiell fase, noe som støtter opp under denne antagelsen (resultater fra glyseroltilsatt er som nevnt ansett som upålitelige). Det overraskende funnet var at også den fotoautotroft dyrkede kulturen av *P. tricornutum* og den acetatilsatte kulturen av *I. galbana* hadde et lavere innhold av fettsyrer i stasjonær fase *til tross for* et betydelig høyere C:N-forhold og redusert

veksthastighet. Et økt lipidinnhold er forventet når forhold ikke er optimale for vekst og algene er stressede (Steinrücken et al., 2017). Det kan ut fra totalt fettsyreinnhold virke som disse to kulturene derfor var mindre stresset i stasjonær enn i eksponentiell fase, men det er uklart hvorfor det ikke resulterte i økt vekst og at andelen mettede og enumettede fettsyrer var høyere i stasjonær enn i eksponentiell fase.

Liu et al. (2009) fant at tilsetning av 0,1 M glukose, glyserol og acetat resulterte i økt respirasjon og biomasseproduktivitet, samtidig som det førte til lavere pigmentinnhold og redusert effektivitet av PSII. Selv om det ikke ble gjort målinger av pigmentinnhold eller oksygenproduksjon, er det på bakgrunn av utviklingen i C:N-forhold og lavere produktivitet og maksimal biomassetetthet i kulturer tilsatt glukose og glyserol, grunn til å mistenke at disse karbonsubstratene har resultert i en redusert fotosynteseaktivitet hos *P. tricornutum*. Dette kan ha ført til at algecellene ble nødt til å bryte ned egne cellekomponenter for å få energi når den eksternt tilsatte organiske karbonkilden var brukt opp. Kulturen tilsatt glukose viste et lavere fettsyreinnhold i stasjonær fase, som kan indikere at algene har gjort nettopp det, men forskjellen var ikke signifikant. Totalt fettsyreinnhold i kultur tilsatt glyserol i stasjonær fase var også svært mye lavere enn i eksponentiell fase, men resultatet for stasjonær fase ble ansett som upålitelig på grunn av stort standardavvik. En mulig tolkning er at algene taper noe karbon ved at heterotrofe bakterier i kulturene bryter ned karbohydrater fra algen når tilgangen på organisk karbon i medium er liten. Mikroalger produserer en større grad av ekstracellulære polymere substanser (EPS) under stressforhold, som gjennom ulike mekanismer beskytter cellen mot skade (Xiao & Zheng, 2016). Disse substansene består av en høy grad av karbohydrater som kan benyttes som næringskilde for heterotrofe organismer (Gügi et al., 2015). En økt investering av karbon til ekstracellulære substanser kan potensielt ha vært en bidragsytende faktor for den observerte nedgangen i C:N-forholdet i disse algekulturene.

5.1.4 Valg av alge og karbonsubstrat til forsøk i turbidostat-reaktor

Tilskudd av acetat til kultur av *P. tricornutum* førte til høy lipidproduktivitet til tross for lavt lipidinnhold per gram biomasse. Sammen med den gunstige fettsyrefordelingen med høy andel EPA og andre flerumettede fettsyrer, gjorde dette at *P. tricornutum* og acetat ble valgt ut til forsøk i turbidostat-reaktor for å teste hvorvidt produktivitet og fettsyreinnhold kunne

økes videre ved dyrking som kontinuerlig kultur med L/M syklus. Pris på karbonsubstrat vil dra opp totale produksjonskostnader når det skal produseres i storskala og må derfor vurderes opp mot produksjonsinntekter. I en artikkel fra 2014 ble prisen på glukose, glyserol og acetat oppgitt å være henholdsvis 0,5-0,8, 0,6 – 0,7 og 0,9-0,94 amerikanske dollar per kilo. (Choi et al., 2018; Park et al., 2014). Dersom man antar at det relative prisforholdet mellom karbonsubstratene ikke har endret seg betydelig, er acetat det desidert rimeligste alternativet for dyrkning med konsentrasjonene benyttet i dette prosjektet.

5.2 Kontinuerlig kultur

5.2.1 Effekt av acetat ved dyrking med lys/mørke-syklus

Det observerte biomassetapet for kulturer dyrket med L/M syklus tyder på at *P. tricornutum* ikke er i stand til å assimilere acetat og vokse i mørket, noe som er i samsvar med funn fra annen forskning som viser at *P. tricornutum* ikke kan vokse utelukkende heterotroft (Ceron Garcia et al., 2006; Hayward, 1968), og at karbon lagret i form av proteiner, karbohydrater og TAG gjennom lysperiode brukes som energikilder til vedlikeholdsprosesser og respirasjon gjennom natten (Jallet et al., 2016). Benavides et.al (2013) gjennomførte et dyrkingsforsøk av *P. tricornutum* UTEX 640 som sirkulerende kultur i utendørs fotobioreaktor utformet med horisontale rør (uten tilskudd av organisk karbon). De observerte et tap på 21,4 - 30 % av biomassen og en reduksjon i fettsyreinhold på ca. 7 % gjennom natt, dessuten at mørkeperiode ikke førte til en signifikant ulikhet i fettsyreprofil mellom dag og natt. Effekten jeg observerte av mørkeperiode både med og uten acetattilsetning var derimot at mørkeperioden førte til en økning i fettsyreandel per gram biomasse, og at det hadde en uttalt effekt på fettsyredistribusjonen med en høyere andel flerumettede fettsyrer etter 6 timer i mørke. Dette kan være et bevis på metabolske forskjeller mellom ulike isolater av *P. tricornutum*, men det må understrekes at oppsettet og kultiveringsforholdene i mitt forsøk skiller seg klart fra forsøket til Benavides (2013). I en industriell produksjon av alger er selvfølgelig tap av biomasse noe man ønsker å minimere for å oppnå en mest mulig lønnsom prosess. Flere teknikker kan brukes for å redusere respirasjon hos mikroalger, for eksempel senkning av temperatur og oksygentilførsel og redusert blanding av kultur i mørkeperiode (Edmundson & Huesemann, 2015). Fordi biomassetapet gjennom mørkeperioden var betydelig, men totalt fettsyreinhold før og etter mørkeperiode ikke var signifikant forskjellig

verken i kulturer dyrket med eller uten acetat, kan dette tyde på at høsting av *P. tricornutum* burde gjøres mot slutten av lys-periode istedenfor etter mørke-periode for å oppnå optimalisering av utbytte. Ved å studere metabolsk respons hos *P. tricornutum* etter 4 dager i mørke, observerte Bai et al. (2016) en økning i proteiner involvert i glykolyse og fettsyresyntese og 2,3 ganger økning i lipidinnhold (Bai et al., 2016). Samtidig fant de at enzymer involvert i betaoksidasjon (katabolisme av fettsyrer) ble nedregulert. De observerte også at andel flerumettede fettsyrer, inkludert EPA økte. Jeg observerte ikke en signifikant økning i totalt fettsyreinnhold etter mørkeperiode verken for kultur tilsatt acetat eller kultur uten slik tilsetning. Jeg så derimot en signifikant økning i andelen flerumettede fettsyrer, spesielt EPA, i begge kulturer. Med tanke på industriell produksjon av disse fettsyrene kan lys/mørke-syklus utgjøre en svært interessant dyrkingsstrategi, både fordi det kan øke produksjon, men samtidig være kostnadsbesparende gjennom redusert energiforbruk i form av lys.

Målinger av bakterieinnhold viste at antall bakterier økte signifikant mellom hvert av de tre forsøkene. Dette kan ha bidratt til svekket pålitelighet av resultater fra forsøk nummer to og tre (18:6 m/acetat og 24:0 u/acetat), siden det høye bakterienivået etter all sannsynlighet bidro til en lavere vekst og overlevelsessevne for *P. tricornutum*. C:N-forholdet økte mellom hvert av forsøkene i kontinuerlig kultur, og til tross for mindre grad av tetthet og lavere celledensitet i kultur med 24-timers belysning var dette kulturen med høyest karboninnhold. Noe av karbonet må antas å stamme fra bakterieinnholdet, som var signifikant høyere enn i begge kulturer dyrket med L/M syklus. Det økende karboninnholdet kan også signalisere redusert veksthastighet (Hillebrand & Sommer, 1999).

5.2.2 Effekt av lys/mørkesyklus ved dyrking med acetat

Målinger av acetatinnhold i medium av kultur med L/M-syklus og kontinuerlig belysning viser at ~ 95 % av tilsatt acetat var brukt opp, og indikerer dermed at *P. tricornutum* assimilerer acetat. En interessant observasjon av kultur dyrket med L/M-syklus var et høyere acetatinnhold etter mørkeperiode, da medium (og dermed acetat) ikke ble tilført kulturen. Forskjellen var ikke signifikant og kan skyldes unøyaktigheter i måling, men det er likevel interessant at alle målinger etter mørkeperiode gjennom «steady state» viste denne tendensen. Acetogene (acetatproduserende) bakterier er obligat anaerobe (Drake et al., 2008), men de

kontinuerlige kulturene hadde konstant luftgjennomstrømning og det virker derfor lite sannsynlig at acetogene bakterier skal være årsak til den registrerte økningen i acetat gjennom mørkeperiode. Zhuang et al. (2019) peker på at acetat i den oksiske vannkolonnen i havet kan produseres av fermenterende bakterier i anaerobe mikrosoner som kan finnes i f.eks. marin snø. Analyse av kulturens bakterieinnhold gjennom 16S-rRNA sekvensering og qPCR ville vært interessant for å avdekke om, og i så fall i hvilken grad fermenterende bakterier har vært tilstede og produsert acetat. En mer nærliggende teori er at noe medium i filter og slange ble tilført kulturen selv etter at pumpen ble slått av ved start av mørkeperiode. Det at acetatinnhold i næringsmedium ikke går ned gjennom mørkeperiode er et tegn på at *P. tricornutum* ikke er i stand til å assimilere acetat uten lys. Dette er i strid med funnene til Cooksey (1974) som konkluderte med at acetat ble assimilert både i lys og mørke. Flere studier konkluderer derimot med at *P. tricornutum* ikke kan vokse utelukkende heterotroft (Hayward, 1968; Lewin, 1958) og Chauton et al. (2013) viste at opp- og nedregulering av gener involvert i fiksering, lagring og nedbrytning av karbon er svært koordinerte over lys/mørke-syklus. De viser videre at gener for fotosyntetisk aktivitet og karbonassimilering blir oppregulert i lysperiode og nedregulert i mørkeperiode, mens gener involvert i nedbrytning av karbonrike komponenter og celledeling oppreguleres i mørkeperiode og nedreguleres i lysperiode.

Lipidinnhold i mg/g biomasse var høyest i kulturen med kontinuerlig belysning. Dette kan tolkes som at acetat stimulerer til lipidlagring i *P. tricornutum*, men det er også kjent at mikroalger responderer på stressfaktorer med akkumulering av lipider (Cheirsilp & Torpee, 2012; Zhu et al., 1997). Med tanke på at dette var kulturen med høyest bakterieinnhold, signifikant lavest biomasseproduktivitet, og at det ble observert en stor mengde bunnfall og en nedgang i tetthet og celletall, er det nærliggende å foreslå at denne kulturen var stresset og at det har bidratt til økt lipidinnhold. Dette gjør det vanskelig å vurdere i hvilken grad det høye lipidinnholdet skyldtes acetat og kontinuerlig belysning og hvor mye som skyldes alder på kultur og andre stressforhold. Kulturen dyrket med acetat og kontinuerlig belysning resulterte i lavere prosentvist innhold av EPA og flerumettede fettsyrer og signifikant lavere produktivitet enn kulturen dyrket med L/M syklus. Etter all sannsynlighet gjenspeiler resultatene i stor grad «alderen» av kulturen. Både tetthet i kultur og celleantall gikk ned over de tre dagene i «steady state». Mye bunnfall ble også observert i kultur med kontinuerlig belysning og acetat, og på dag 3 av «steady state» ble det målt en jevn økning i sekundært lys (vedlegg B.3.). Det er vist at ovale celler har høyere sedimentasjonsrate enn triradiate og

fusiforme celler (De Martino et al., 2011), men fordelingen av de tre morfologiske celleformene bekreftet ikke at ovale celler var overrepresentert i denne kulturen sammenlignet med de to andre. Innholdet var tvert imot i større grad dominert av fusiforme celler. I havet vil oppblomstringer av diatomeer avsluttes ved en «masse-synking» av algeceller når miljøforholdene ikke lenger er gunstige. Ved overgang fra høy vekst til en «hvile» fase vil cellene aggregere og synke, blant annet ved hjelp av økt vekt av skall som fungerer som ballast og bidrar til at cellen synker i vannkolonnen (Smetacek, 1985). EPS produsert av alger og bakterier bidrar til dannelse av aggregater mellom celler og annet partikulært materiale (Manheim & Nelson, 2013; Quijano et al., 2017). På bakgrunn av tetthetsmålinger, målinger av bakterieinnhold og observasjon av bunnfall er det grunnlag for å trekke slutningen at algekulturen på dette tidspunktet ikke hadde optimale vekstforhold og at kulturen ikke var i en ekte «steady state» med eksponentiell vekst.

5.3 Diskusjon rundt metoder

5.3.1 Batch-kulturer

For å vurdere resultater fra eksponentiell og stasjonær fase er det sentralt at algene befinner seg i riktig fase på tidspunkt for prøvetaking. Som nevnt innledningsvis i diskusjonen tyder resultater på at prøvetakingen for eksponentiell fase av kulturer tilsatt glukose og glyserol ble gjort sent og i realiteten var nærmere stasjonær fase. Det er utfordrende å vurdere når denne fasen finner sted under kultivering og ideelt sett burde prøvetaking til fettsyreanalyser blitt gjort daglig, for så i ettertid å vurdere hvilke prøver som representerte eksponentiell fase. Dette lot seg ikke gjøre da prøver til eksponentiell (og også stasjonær) fase innebar et uttak på ca. 1/6 av kulturens volum. Et alternativ kunne vært å gjennomføre for eksempel 2 uttak. Det høye bakterieinnholdet i kulturer tilsatt glukose og glyserol førte til en usikkerhet knyttet til vurderingen av resultatene fra disse kulturene opp mot kulturer dyrket fototroft og med acetattilsetning. Mengden av bakterier i inokulum burde derfor blitt forsøkt redusert gjennom filtrering og/eller sentrifugering, vasking av algecellene i forkant av kultivering og/eller bruk av antibakterielle midler.

5.3.2. *Kontinuerlig kultur*

Kontinuerlig kultur ble på grunn av hensyn til tidsplan holdt gående mellom de tre forsøkene uten demontering og autoklaving av kolbe og nytt inokulum for hvert forsøk. Dette hadde etter all sannsynlighet en stor innvirkning på resultatene, da det ble observert betydelig bakterievekst gjennom dyringsperioden, særlig for kultur dyrket med kontinuerlig belysning som var det siste av de tre forsøkene. Et alternativ som ville medført et bedre grunnlag for sammenligning, ville vært å starte de tre dyringsforsøkene som nye kulturer i sterilisert reaktor.

Konklusjon

Del I: batch-forsøk

Forsøket viste at veksthastighet av *P. tricornutum* kan økes ved mikсотrof kultivering med glyserol og acetat som organiske karbonsubstrater. Veksthastighet av *I. galbana* kan økes ved supplering av glukose og glyserol. Alle kulturer tilsatt organisk karbonsubstrat hadde en ulik fettsyresammensetning enn fotoautotroft dyrket kultur av *P. tricornutum*, hvorav acetat var det eneste som førte til en signifikant høyere andel og lipid-produksjon av flerumettede fettsyrer. Acetat fremstår derfor som et lovende karbonsubstrat å benytte for mikсотrof kultivering av *P. tricornutum* med produksjon av omega-3 fettsyren EPA og andre flerumettede fettsyrer som formål. For *I. galbana* førte supplering av glukose og acetat til en signifikant økning i produktivitet av flerumettede fettsyrer, og anses ut fra dette forsøket som de mest lovende karbonsubstratene for produksjon av omega-3 fettsyren DHA og andre flerumettede fettsyrer. Det høye bakterieinnholdet i kulturer av begge alger tilsatt glukose og glyserol, har etter all sannsynlighet hatt stor påvirkning på resultatene og svekker sammenligningsgrunnlaget opp mot acetattilsatt og fotoautotroft dyrket kultur. Forsøkene må gjentas dersom jeg med større sikkerhet skal kunne konkludere med hvilke organiske karbonsubstrater som egner seg best for mikсотrof kultivering av *P. tricornutum* og *I. galbana*.

Del II: Kontinuerlig kultur

Dyrking i kontinuerlig kultur gir mulighet for høyere produktivitet og kontroll over kultiveringsforhold. Gjennom dyrkingsforsøk av *P. tricornutum* som kontinuerlig kultur i turbidostat-reaktor observerte jeg en økning i andel EPA og andre flerumettede fettsyrer etter 6 timers mørkeperiode i kultur med og uten tilsatt acetat. Lys/mørke syklus kan derfor være en mulig strategi for å øke produksjon av disse fettsyrene. Hypotesen etter resultatene fra batch-forsøket var at acetat skulle resultere i økt innhold og produktivitet av flerumettede fettsyrer i kontinuerlig kultur, noe som ikke skjedde. Mistanken om nedadgående helsetilstand i den kontinuerlige kulturen over tid, gjør at jeg ikke vil konkludere med at lys/mørke-syklus uten tilsetning av acetat er den mest lovende tilnærmingen for industriell produksjon, men heller foreslå at forsøket blir gjentatt.

Videre arbeid

Den variable responsen i produktivitet og fettsyresammensetning i *I. galbana* og *P. tricornutum* til glukose, glyserol og acetat viser at organiske karbonsubstrater kan trigge endringer i metabolske prosesser og dermed også biomassekomposisjon. Gjennom sammenligning av resultatene fra denne studien med annen forskning, blir det tydelig hvordan også andre abiotiske faktorer som lys og temperatur spiller sentrale roller for algenes metabolske aktivitet. Dette belyser viktigheten av å gjennomføre mikсотrofe vekstforsøk som også tester algenes respons på disse faktorene, for å oppnå optimalisering av en industriell produksjonsprosess. En utfordring som gikk igjen når jeg vurderte karbonsubstrateneffekt på algene, var høy bakteriell vekst, særlig i kulturer tilsatt glukose og glyserol. Et gjentakende forsøk med større kontroll på det bakterielle innholdet i algekulturene vil gi et bedre grunnlag til å vurdere effekten av de ulike karbonsubstratene. I tillegg til metoder for å redusere bakterieinnhold i inokulum og testing av ulike strategier for tilsetning av organisk karbonsubstrat, kan bruk av antibakterielle midler være et alternativ. Hydrogenperoksid er et vanlig desinfeksjonsmiddel å benytte til sterilisering av utstyr og overflater (Linley et al., 2012). Et interessant funn av Burch & Franz (2016) er at tilsetning av fortynnede løsninger hydrogenperoksid kan øke lipidakkumulering i *P. tricornutum*. Et annet alternativ er å bruke antibiotika, men på grunn av utfordringene knyttet til resistens som følge av overforbruk ser jeg ikke på dette som et naturlig førstevalg for kontroll av bakteriell vekst (Pruden et al., 2013). Utover dette vil jeg foreslå å gjenta dyrking med og uten de organiske karbonsubstratene og kartlegge algenes respons til lavere og høyere lysstyrker og temperaturer. Et arbeid for å teste avfall fra ulike typer industrier og kartlegge algenes respons på disse vil også være spennende. Avfall fra fermenteringsprosesser vil være interessante substrater ettersom de kan være rike på acetat (Hwang et al., 2014). Jeg fant at *I. galbana* tilført acetat resulterte i signifikant høyere maksimal biomassetetthet og fettsyreakkumulering enn fotoautotroft dyrket kultur i eksponentiell fase, sammen med et gunstig innhold av DHA og andre flerumettede fettsyrer. Disse noe uventede observasjonene gjør at det vil være spennende å utføre flere dyrkingsforsøk av *I. galbana* med acetat, for å finne ut om lys/mørke-syklus vil kunne bidra til å øke produktiviteten ytterligere. *P. tricornutum* er en interessant alge for kommersiell utnyttelse da den vokser raskt, har en betydelig lipidproduksjon og høy andel EPA og andre flerumettede fettsyrer. Jeg fastslo på bakgrunn av bakteriemåling og ustabile kultiveringsparametere for kulturen dyrket med kontinuerlig belysning, at *P. tricornutum* ikke hadde optimale forhold i dette forsøket. Også

kultur dyrket med L/M-syklus og tilsetning av acetat bar preg av et høyere bakterieinnhold enn kultur dyrket uten acetat tilsetning. Dette kan ha gitt et uklart bilde av de faktiske effektene av acetat og lys/mørke-syklus. For å teste påliteligheten til resultatene fra forsøk av *P. tricornutum* i kontinuerlig kultur bør disse forsøkene gjentas. Videre forsøk i turbidostat kan være å teste ut hvordan ulike lys-styrker og lys-sykluser vil påvirke biomasse og lipidproduktivitet/sammensetning både med og uten acetat og potensielt oppskalere til et større pilotanlegg. En interessant tilnærming vil også være å simulere lysforhold i Norge som en pekepinn på potensialet for industriell produksjon av *P. tricornutum* her til lands.

Referanser

- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, 11(1), 96.
- Ahmed, M. K., Ahmed, F., Tian, H., Carne, A., & Bekhit, A. E. D. (2020). Marine omega-3 (n-3) phospholipids: A comprehensive review of their properties, sources, bioavailability, and relation to brain health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 64-123.
- Alkhamis, Y., & Qin, J. G. (2013). Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *BioMed research international*, 2013.
- Altieri, A. H., & Gedan, K. B. (2015). Climate change and dead zones. *Global change biology*, 21(4), 1395-1406.
- Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, 459(7244), 185-192.
- Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Babu, P. A. S., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2014). Effect of photoperiod, light intensity and carbon sources on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. *Biotechnology letters*, 36(8), 1653-1660.
- Bai, X., Song, H., Lavoie, M., Zhu, K., Su, Y., Ye, H., Chen, S., Fu, Z., & Qian, H. (2016). Proteomic analyses bring new insights into the effect of a dark stress on lipid biosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2014). DRUM: a new framework for metabolic modeling under non-balanced growth. Application to the carbon metabolism of unicellular microalgae. *PloS one*, 9(8).
- Beacham, T., Macia, V. M., Rooks, P., White, D., & Ali, S. (2015). Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis. *Biotechnology Reports*, 7, 87-94.
- Becker, W. (2004). 18 microalgae in human and animal nutrition *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 312): Wiley Online Library.
- Benavides, A. M. S., Torzillo, G., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and bioenergy*, 54, 115-122.
- Bimbo, A. (2013). Sources of omega-3 fatty acids *Food enrichment with omega-3 fatty acids* (pp. 27-107): Elsevier.

- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 313-321. doi:10.1016/S0168-1656(99)00083-8
- Borowitzka, M. A. (2010). Carotenoid production using microorganisms *Single cell oils* (pp. 225-240): Elsevier.
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). *Algae for biofuels and energy* (Vol. 5): Springer.
- Borowitzka, M. A., & Volcani, B. E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of ITS morphotypes 1, 2. *Journal of Phycology*, 14(1), 10-21.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., & Otilar, R. P. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239.
- Brown, M., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 247-255.
- Burch, A. R., & Franz, A. K. (2016). Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology*, 219, 559-565.
- Ceron Garcia, M., Camacho, F. G., Mirón, A. S., Sevilla, J. F., Chisti, Y., & Grima, E. M. (2006). Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(5), 689.
- Chauton, M. S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O., & Bones, A. M. (2013). Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant physiology*, 161(2), 1034-1048.
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516.
- Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in biotechnology*, 14(11), 421-426.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Choi, H.-J., Lee, S.-Y., Choi, H.-J., & Lee, S.-Y. (2018). Advances in microalgal biomass/bioenergy production with agricultural by-products: Analysis with various growth rate models. *Environmental Engineering Research*, 24(2), 271-278.
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 29(6), 686-702.
- Chu, W.-L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *IeJSME*, 6(1), S24-S37.

- Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*, 44(5), 1813-1819.
- Cooksey, K. E. (1974). ACETATE METABOLISM BY WHOLE CELLS OF PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN 1 2. *Journal of Phycology*, 10(3), 253-257.
- Cui, Y., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2019). Phaeodactylum tricornutum microalgae as a rich source of omega-3 rich oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food chemistry*.
- De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U., & Bowler, C. (2011). Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom Phaeodactylum tricornutum. *Protist*, 162(3), 462-481.
- Deschênes, J.-S. (2016). A bacteriostatic control approach for mixotrophic cultures of microalgae. *IFAC-PapersOnLine*, 49(7), 1074-1078.
- Drake, H., G ößner, A., & Daniel, S. (2008). Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 100.
- Dunstan, G., Volkman, J., Barrett, S., & Garland, C. (1993). Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(1), 71-83.
- Edmundson, S. J., & Huesemann, M. H. (2015). The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, Chlorella sorokiniana, Nannochloropsis salina and Picochlorum sp. *Algal research*, 12, 470-476.
- Eikrem, W., Medlin, L. K., Henderiks, J., Rokitta, S., Rost, B., Probert, I., Throndsen, J., & Edvardsen, B. (2016). Haptophyta *Handbook of the Protists* (pp. 1-61): Springer.
- Eizadora, T. Y., Zendejas, F. J., Lane, P. D., Gaucher, S., Simmons, B. A., & Lane, T. W. (2009). Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms Thalassiosira pseudonana and Phaeodactylum tricornutum (Baccilariophyceae) during starvation. *Journal of Applied Phycology*, 21(6), 669.
- Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis research*, 39(3), 235-258.
- Falkowski, P. G., & LaRoche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*, 27(1), 8-14.
- Free, C. M., Thorson, J. T., Pinsky, M. L., Oken, K. L., Wiedenmann, J., & Jensen, O. P. (2019). Impacts of historical warming on marine fisheries production. *science*, 363(6430), 979-983.

- Frost, S. (2010). Global overview of the marine and algal oil EPA and DHA omega-3 ingredients market. *Frost & Sullivan, Global Organisation for EPA and DHA omega-3, Chicago*.
- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó. S., Palsson, B. Ø., & Brynjólfsson, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2395-2403.
- García, M. C., Sevilla, J. F., Fernández, F. A., Grima, E. M., & Camacho, F. G. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 239-248.
- García, M. C., Mirón, A. S., Sevilla, J. F., Grima, E. M., & Camacho, F. G. (2005). Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, 40(1), 297-305.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *science*, 327(5967), 812-818.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports*, 34(4), 545-555.
- Guesnet, P., & Alessandri, J.-M. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS)—implications for dietary recommendations. *Biochimie*, 93(1), 7-12.
- Guevara-Gonzalez, R., & Torres-Pacheco, I. (2014). *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*: Springer.
- Guiry, M., & Guiry, G. (2017). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2017. URL: <http://www.algaebase.org>.
- Gügi, B., Le Costaouec, T., Burel, C., Lerouge, P., Helbert, W., & Bardor, M. (2015). Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Marine drugs*, 13(9), 5993-6018.
- Hagos, D. A., Gebremedhin, A., & Zethraeus, B. (2014). Solar water heating as a potential source for inland Norway energy mix. *Journal of Renewable Energy*, 2014.
- Halim, R., Webley, P. A., & Martin, G. J. (2016). The CIDES process: fractionation of concentrated microalgal paste for co-production of biofuel, nutraceuticals, and high-grade protein feed. *Algal research*, 19, 299-306.
- Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic engineering*, 22, 3-9.

- Hamilton, M. L., Warwick, J., Terry, A., Allen, M. J., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2015). Towards the industrial production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids from a genetically modified diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one*, *10*(12).
- Harder, R., & von Witsch, H. (1942). *Über Massenkultur von Diatomen*.
- Hawkins, R. L., & Nakamura, M. (1999). Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Current microbiology*, *38*(6), 335-341.
- Hayward, J. (1968). Studies on the Growth of *Phaeodactylum tricornutum*: II. The Effect of Organic Substances on Growth. *Physiologia Plantarum*, *21*(1), 100-108.
- Helland, I. B., Smith, L., Blomén, B., Saarem, K., Saugstad, O. D., & Drevon, C. A. (2008). Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age. *Pediatrics*, *122*(2), e472-e479.
- Hillebrand, H., & Sommer, U. (1999). The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnology and Oceanography*, *44*(2), 440-446.
- Hirakawa, Y. (2017). *Secondary Endosymbioses*: Academic Press.
- Huang, A., Liu, L., Yang, C., & Wang, G. (2015). *Phaeodactylum tricornutum* photorespiration takes part in glycerol metabolism and is important for nitrogen-limited response. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 73.
- Hwang, J.-H., Kabra, A. N., Kim, J. R., & Jeon, B.-H. (2014). Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate-and butyrate-rich wastewater effluent. *Energy*, *78*, 887-894.
- Jallet, D., Caballero, M. A., Gallina, A. A., Youngblood, M., & Peers, G. (2016). Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal research*, *18*, 51-60.
- Jensen, G. S. (2001). Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, *3*, 24-30.
- Joint, F. (2011). WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission Thirty-fourth Session Geneva: Switzerland.
- JONES, H. (1997). A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biology*, *37*(1), 35-43.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (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*(1), 36.

- Kim, S.-K. (2015). *Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances*: Academic Press.
- Kim, S. M., Kang, S.-W., Kwon, O.-N., Chung, D., & Pan, C.-H. (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(4), 477-483.
- Konagai, C., Yanagimoto, K., Hayamizu, K., Han, L., Tsuji, T., & Koga, Y. (2013). Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Clinical interventions in aging*, 8, 1247.
- Kotake-Nara, E., Asai, A., & Nagao, A. (2005). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer letters*, 220(1), 75-84.
- Lawrence, D., & Vandecar, K. (2015). Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. *Nature climate change*, 5(1), 27-36.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology* (4 ed.). New York, United States of America: Cambridge University Press.
- Lewin, J. C. (1958). The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology*, 18(2), 427-432.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., & Maillard, J.-Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1589-1596.
- Liu, C.-P., & Lin, L.-P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42.
- Liu, J., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2013). Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), 4785-4798.
- Liu, J., Sun, Z., & Chen, F. (2014). Heterotrophic production of algal oils *Biofuels from Algae* (pp. 111-142): Elsevier.
- Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., & Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 239-246.
- Lucas, J. S., Southgate, P. C., & Tucker, C. S. (2019). *Aquaculture: farming aquatic animals and plants*: John Wiley & Sons.
- Málek, I., & Fenel, Z. (2013). *Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms*: Elsevier.

- Manheim, D., & Nelson, Y. (2013). Settling and bioflocculation of two species of algae used in wastewater treatment and algae biomass production. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 32(4), 946-954.
- Marie, D., Brussaard, C. P., Thyraug, R., Bratbak, G., & Vaulot, D. (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(1), 45-52.
- Martino, A. D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. *Journal of Phycology*, 43(5), 992-1009.
- McKee, T., & McKee, J. R. (2009). *Biochemistry: the molecular basis of life*: Oxford University Press Oxford.
- Meier, S., Mjøs, S. A., Joensen, H., & Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, 1104(1-2), 291-298.
- Minowa, T., Yokoyama, S.-y., Kishimoto, M., & Okakura, T. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, 74(12), 1735-1738.
- Mishra, M., Arukha, A. P., Bashir, T., Yadav, D., & Prasad, G. (2017). All new faces of diatoms: potential source of nanomaterials and beyond. *Frontiers in microbiology*, 8, 1239.
- Miyashita, K., Nishikawa, S., Beppu, F., Tsukui, T., Abe, M., & Hosokawa, M. (2011). The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1166-1174.
- Mus, F., Toussaint, J.-P., Cooksey, K. E., Fields, M. W., Gerlach, R., Peyton, B. M., & Carlson, R. P. (2013). Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8), 3625-3642.
- Ogawa, T., & Aiba, S. (1981). Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 1121-1132.
- Pang, N., & Chen, S. (2017). Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Algal research*, 21, 227-235.
- Park, W.-K., Moon, M., Kwak, M.-S., Jeon, S., Choi, G.-G., Yang, J.-W., & Lee, B. (2014). Use of orange peel extract for mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*: Increased production of biomass and FAMES. *Bioresource Technology*, 171, 343-349.

- Patel, A., Matsakas, L., Hružová, K., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2019). Biosynthesis of nutraceutical fatty acids by the oleaginous marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* utilizing hydrolysates from organosolv-pretreated birch and spruce biomass. *Marine drugs*, *17*(2), 119.
- Patil, V., Reitan, K. I., Knutsen, G., Mortensen, L. M., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2005). Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. *Plant Biol*, *6*(6), 57-65.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G., Ross, R., & Stanton, C. (2012). Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012.
- Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T. J., Sumaila, U. R., Walters, C. J., Watson, R., & Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, *418*(6898), 689-695.
- Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., & Salem, N. (2001). Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. *Journal of lipid research*, *42*(8), 1257-1265.
- Pella, E., & Colombo, B. (1973). Study of carbon, hydrogen and nitrogen determination by combustion-gas chromatography. *Microchimica Acta*, *61*(5), 697-719.
- Perin, G., Bellan, A., Segalla, A., Meneghesso, A., Alboresi, A., & Morosinotto, T. (2015). Generation of random mutants to improve light-use efficiency of *Nannochloropsis gaditana* cultures for biofuel production. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 161.
- Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., Hamilton, M., Sayanova, O., Napier, J., & Khozin-Goldberg, I. (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one*, *11*(10).
- Prestegard, S. K., Erga, S. R., Steinrücken, P., Mjøs, S. A., Knutsen, G., & Rohloff, J. (2016). Specific metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* strain isolated from western Norwegian fjord water. *Marine drugs*, *14*(1), 9.
- Prestegard, S. K., Oftedal, L., Coyne, R. T., Nygaard, G., Skjærven, K. H., Knutsen, G., Døskeland, S. O., & Herfindal, L. (2009). Marine benthic diatoms contain compounds able to induce leukemia cell death and modulate blood platelet activity. *Marine drugs*, *7*(4), 605-623.
- Pruden, A., Larsson, D. J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., Lazorchak, J. M., Suzuki, S., Silley, P., & Snape, J. R. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environmental health perspectives*, *121*(8), 878-885.

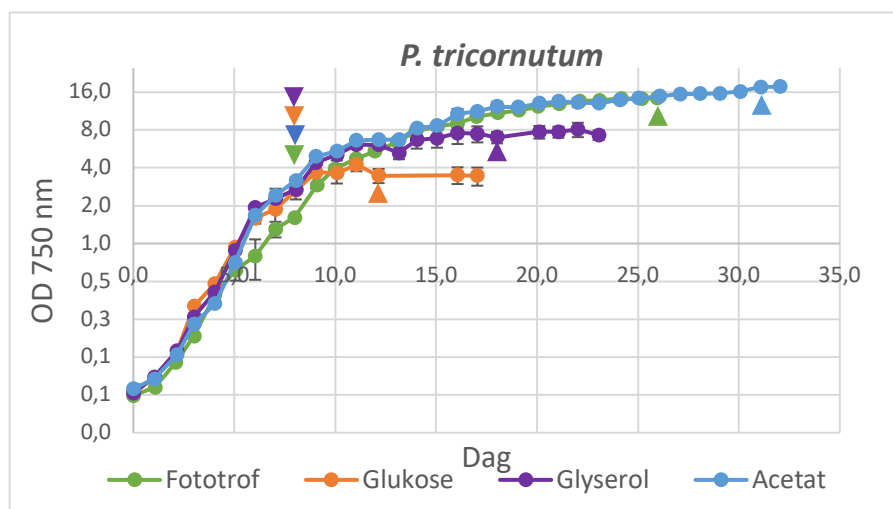
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J. A., Stobart, A. K., & Lazarus, C. M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature biotechnology*, 22(6), 739-745.
- Quijano, G., Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology advances*, 35(6), 772-781.
- Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PloS one*, 12(4).
- Richmond, A. (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*: John Wiley & Sons.
- Ruiz, J., Olivieri, G., de Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Reith, J. H., Eppink, M. H., Kleinegris, D. M., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2016). Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Science*, 9(10), 3036-3043.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food chemistry*, 160, 393-400.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences*, 26(4), 709-722.
- Sayanova, O., & A Napier, J. (2016). Metabolic engineering of microalgae for sustainable production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Current Biotechnology*, 5(3), 198-212.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349-361.
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., & Li-Beisson, Y. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology*, 11(1), 7.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70(3): 560s-569s., 70(3), 560-569.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A., & Salem, N. (1999). Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of nutrition & metabolism*, 43(2), 127-130.
- Smetacek, V. (1985). Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Marine biology*, 84(3), 239-251.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Steinrücken, P., Erga, S. R., Mjøs, S. A., Kleivdal, H., & Prestegard, S. K. (2017). Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal research*, 26, 392-401.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909-941.
- Sukenik, A., & Wahnou, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1), 61-72.
- Toppe, J. Farmed fish: a major provider or a major consumer of omega-3 oils? *GLOBEFISH - Information and Analysis on World Fish Trade*. Retrieved from <http://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resource-detail/en/c/338773/>
- Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., & Stramski, D. (2010). Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochemical Cycles*, 24(3).
- Villanova, V., Fortunato, A. E., Singh, D., Bo, D. D., Conte, M., Obata, T., Jouhet, J., Fernie, A. R., Marechal, E., & Falciatore, A. (2017). Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160404.
- Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Ser.* 2, 26(5).
- Wood, B. (1988). Lipids of algae and protozoa. *Microbial Lipids.*, 807-867.
- Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology advances*, 34(7), 1225-1244.
- Xiao, Y., Guo, J., Zhu, H., Muhammad, A., Deng, H., Hu, Z., & Wu, Q. (2020). Inhibition of glucose assimilation in *Auxenochlorella protothecoides* by light.
- Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical engineering journal*, 6(2), 87-102.

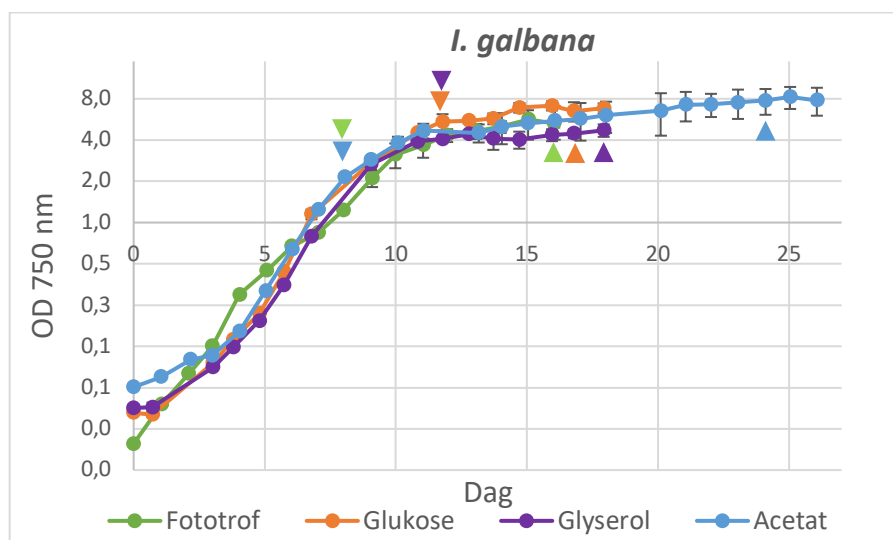
- Yongmanltchal, W., & Ward, O. P. (1992). Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in batch and continuous culture systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(6), 584-590.
- Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International journal of hydrogen energy*, 42(12), 8505-8517.
- Zheng, Y., Quinn, A. H., & Sriram, G. (2013). Experimental evidence and isotopomer analysis of mixotrophic glucose metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbial cell factories*, 12(1), 109.
- Zhu, C., Lee, Y., & Chao, T. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 451-457.
- Zhuang, G. C., Peña-Montenegro, T. D., Montgomery, A., Montoya, J. P., & Joye, S. B. (2019). Significance of acetate as a microbial carbon and energy source in the water column of Gulf of Mexico: implications for marine carbon cycling. *Global Biogeochemical Cycles*, 33(2), 223-235.
- Ziv, N., Brandt, N. J., & Gresham, D. (2013). The use of chemostats in microbial systems biology. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(80), e50168.

Vedlegg A: Batch

A.1: Logaritmiske vekstkurver basert på optisk tetthet

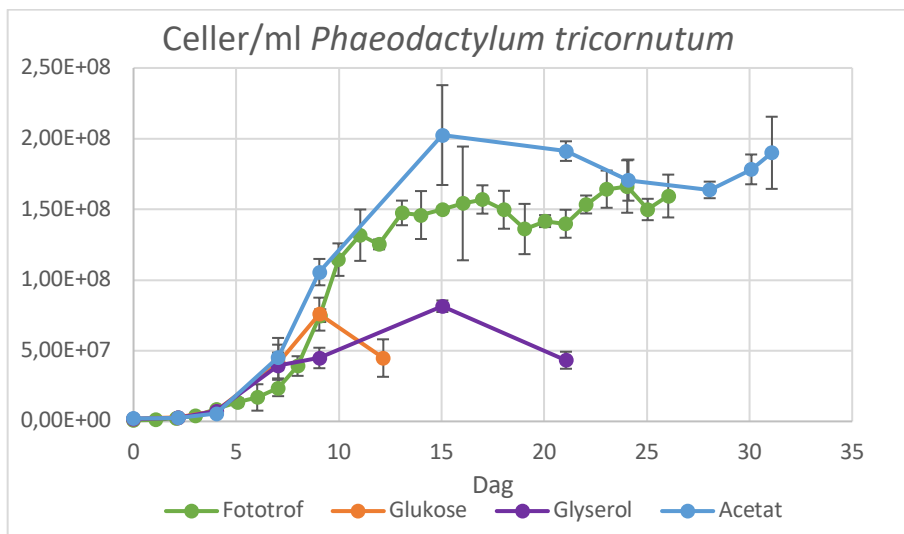


Figur A.1.1 Gjennomsnittlig vekst for *P. tricornutum* med og uten tilsetning av organisk karbon fremvist i logaritmisk skala. Y-akse representerer optisk tetthet (750 nm) og X-akse representerer tid (dager). Usikkerhetsstolper representerer standardavvik. Piler viser dag for prøvetaking for eksponentiell (pil ned) og stasjonær fase (pil opp), og er fargekoordinert etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat)

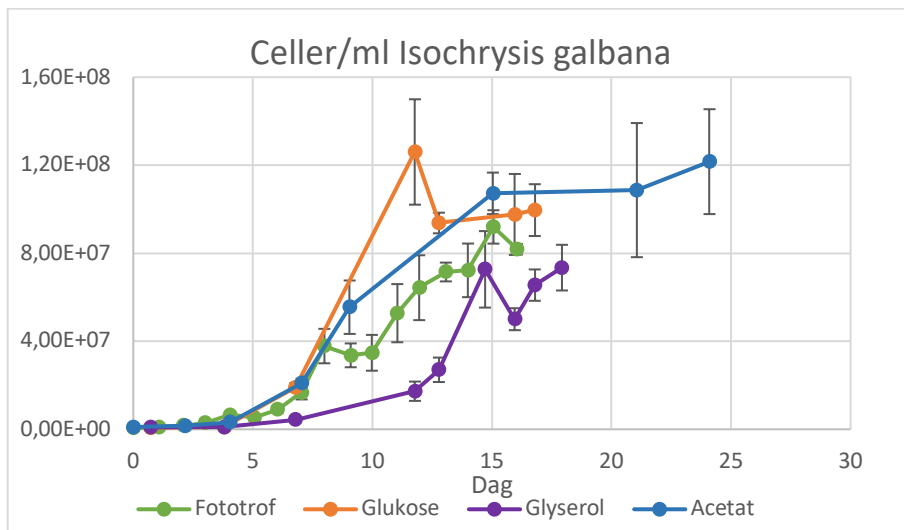


Figur A.1.2. Gjennomsnittlig vekst for *I. galbana* med og uten tilsetning av organisk karbon fremvist i logaritmisk skala. Y-akse representerer optisk tetthet (750 nm) og X-akse representerer tid (dager). Usikkerhetsstolper representerer standardavvik. Piler viser dag for prøvetaking for eksponentiell (pil ned) og stasjonær fase (pil opp), og er fargekoordinert etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat)

A.2: Vekstkurver basert på celletelling i mikroskop



Figur A.2.1. Gjennomsnittlig antall celler/ml av *P. tricornutum* i kulturer med og uten tilsetning av organisk karbon. Fargekoordinering etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat). Y-akse representerer celleantall og X-akse representerer tid (dager). Usikkerhetsstolper representerer standardavvik (n=3).



Figur A.2.2. Gjennomsnittlig antall celler/ml av *I. galbana* i kulturer med og uten tilsetning av organisk karbon. Fargekoordinering etter organisk karbonsubstrat (grønn = uten tilsetning, oransje = glukose, lilla = glyserol, blå = acetat). Y-akse representerer celleantall og X-akse representerer tid (dager). Usikkerhetsstolper representerer standardavvik (n=3).

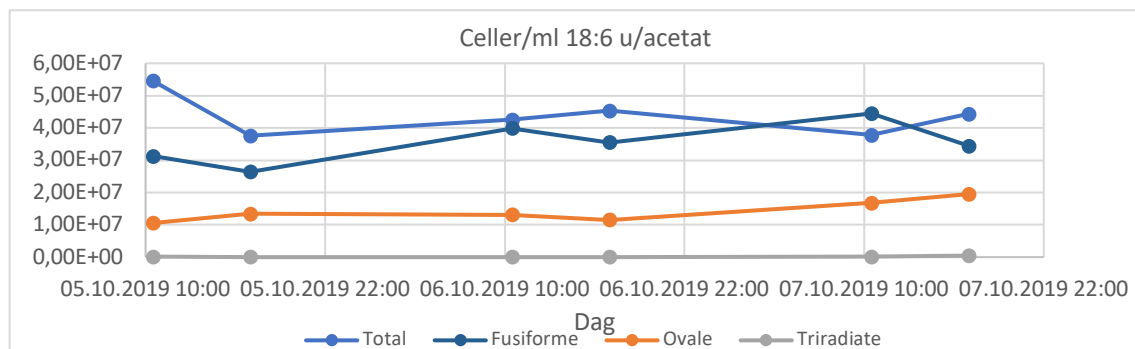
A.3: Karbon og Nitrogen-innhold

Tabell A.3.1: Innhold av karbon (C) og nitrogen (N) i eksponentiell og stasjonær fase av *I. galbana* og *P. tricornutum* dyrket fotoautotroft, med glukose, glyserol og acetat. Verdier er oppgitt i $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3).

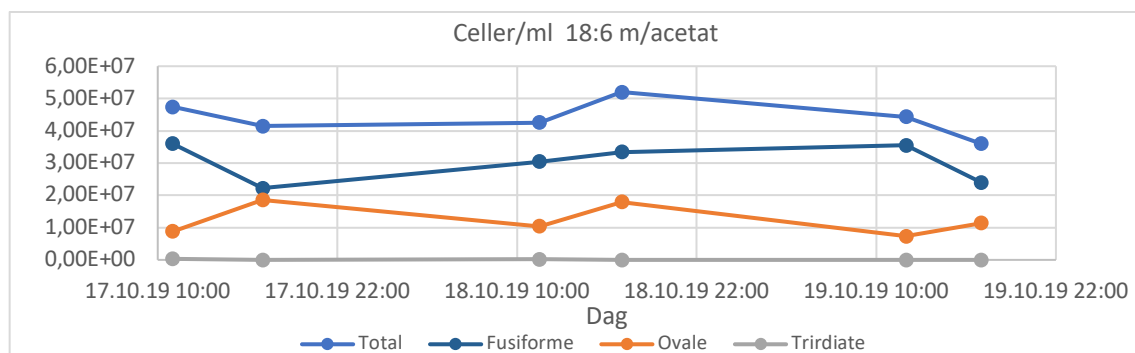
| Karbonkilde | Vekstfase | <i>P. tricornutum</i> | | <i>I. galbana</i> | |
|-----------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | C ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | N ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | C ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | N ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
| Foto | Eksp. | 445,1 \pm 47,1 | 93,9 \pm 7,6 | 400,9 \pm 19,2 | 93,3 \pm 34,1 |
| Glukose | Eksp. | 2082,5 \pm 72,8 | 109,7 \pm 18,2 | 1709,7 \pm 37,0 | 116,2 \pm 13,1 |
| Glyserol | Eksp. | 3092,2 \pm 564,5 | 98,4 \pm 2,9 | 2026,4 \pm 339,9 | 117,3 \pm 47,9 |
| Acetat | Eksp. | 1000,7 \pm 147,8 | 131,8 \pm 6,1 | 730,9 \pm 77,4 | 126,8 \pm 3,2 |
| Foto | Stasj. | 4986,1 \pm 336,0 | 199,4 \pm 20,4 | 1670,6 \pm 261,0 | 232,6 \pm 55,3 |
| Glukose | Stasj. | 1381,2 \pm 6,8 | 107,5 \pm 20,3 | 2578,4 \pm 340,8 | 156,0 \pm 17,9 |
| Glyserol | Stasj. | 2260,4 \pm 304,2 | 97,7 \pm 3,8 | 1929,9 \pm 181,1 | 145,6 \pm 19,9 |
| Acetat | Stasj. | 4902,0 \pm 138,7 | 160,6 \pm 16,9 | 2393,5 \pm 366,6 | 140,5 \pm 3,6 |

Vedlegg B: Resultat kontinuerlig kultur

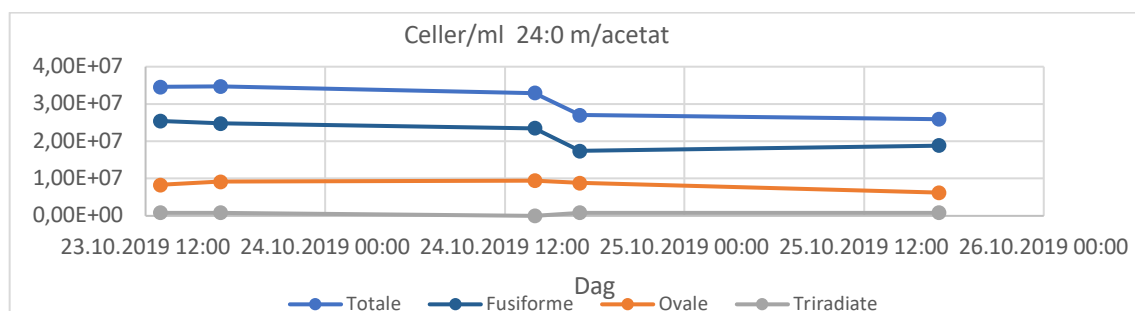
B.1: Celleantall og fordeling i steady state



Figur B.1.1. Antall celler/ml av *P. tricornutum* gjennom «steady state» av kontinuerlig kultur dyrket med 18:6 lys/mørke syklus uten tilskudd av acetat. Figuren viser totalt antall, og fordeling av fusiforme, ovale og triradiate celler.



Figur B.1.2. Antall celler/ml av *P. tricornutum* gjennom «steady state» av kontinuerlig kultur dyrket med 18:6 lys/mørke syklus med tilskudd av acetat. Figuren viser totalt antall, og fordeling av fusiforme, ovale og triradiate celler.



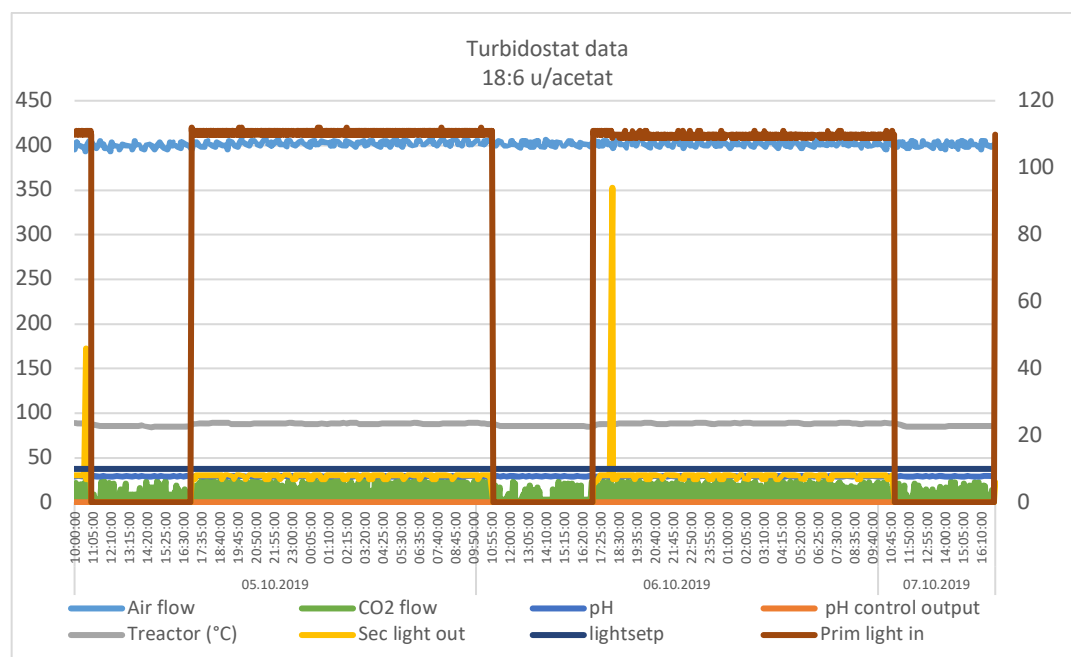
Figur B.1.3. Antall celler/ml av *P. tricornutum* gjennom «steady state» av kontinuerlig kultur dyrket med 24-timers belysning med tilskudd av acetat. Figuren viser totalt antall, og fordeling av fusiforme, ovale og triradiate celler.

B.2: Karbon og Nitrogen-innhold

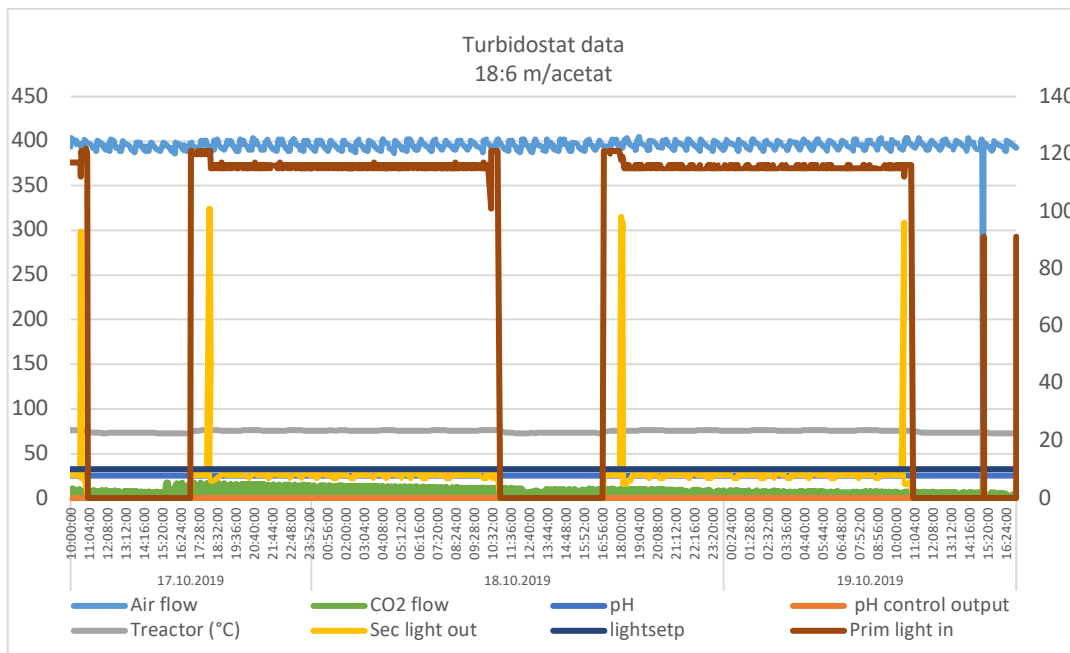
Tabell B.2.1: Innhold av karbon (C) og nitrogen (N) i *P. tricornutum* dyrket som kontinuerlig kultur med 18:6 L/M-syklus uten acetat, 18:6 L/M-syklus med acetat og kontinuerlig belysning med acetat. EL=Etter Lys, EM= Etter Mørke. Verdier er oppgitt i $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3).

| <i>P. tricornutum</i> | | | |
|-----------------------|-----|-----------------------------|-----------------------------|
| Kultur | Tid | C ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | N ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
| 18:6 u/acetat | EL | 730,3 \pm 23,6 | 209,0 \pm 51,3 |
| | EM | 656,9 \pm 21,6 | 189,9 \pm 36,9 |
| 18:6 m/acetat | EL | 802,9 \pm 91,6 | 178,3 \pm 19,8 |
| | EM | 762,3 \pm 79,9 | 163,5 \pm 15,6 |
| 24:0 m/acetat | - | 779,0 \pm 37,6 | 150,7 \pm 5,4 |

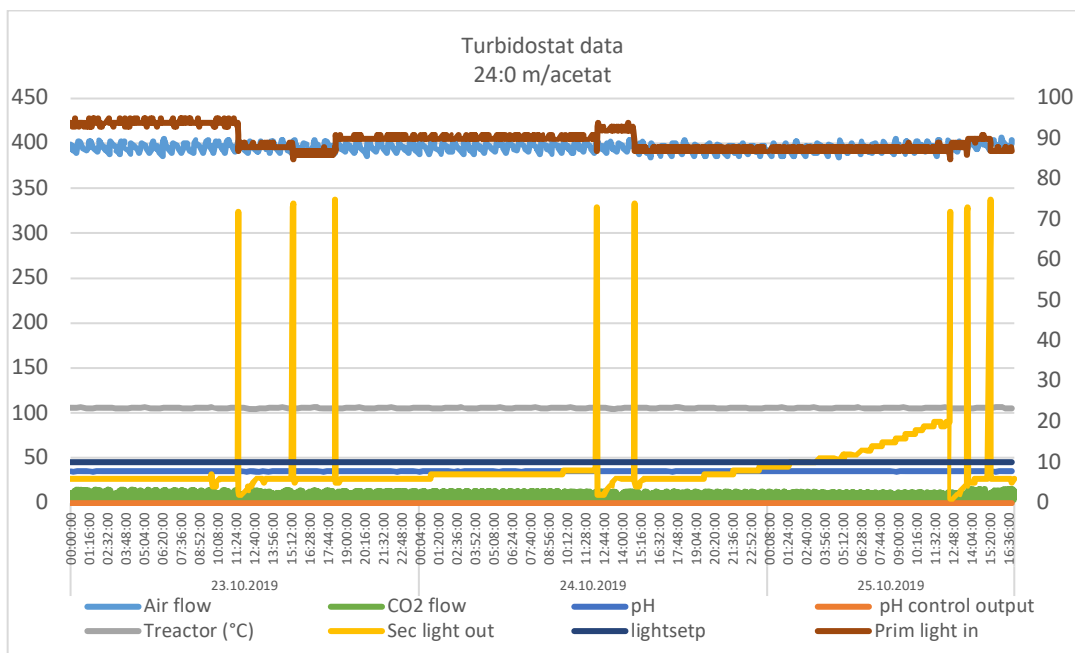
B.3: Loggførte kultiveringsparametere gjennom steady state



Figur B.3.1. Kultiveringsparametere i «steady state» for kontinuerlig kultur av *P. tricornutum* dyrket med 18:6 lys/mørke syklus uten acetat tilsatt medium.



Figur B.3.2. Kultiveringsparametere i «steady state» for kontinuerlig kultur av *P. tricornutum* dyrket med 18:6 lys/mørke syklus i acetattilsatt medium.



Figur B.3.3. Kultiveringsparametere i «steady state» for kontinuerlig kultur av *P. tricornutum* dyrket med 24 timers belysning i acetattilsatt medium.

B.4: Acetatinnhold

Tabell B.4.1: Relative mengder (%) av acetat gjenværende i kulturmedium av kontinuerlige kulturer av *P. tricornutum* dyrket med tilskudd av acetat, målt før og etter mørkeperiode gjennom 3 dager av «steady state».

| Relativ mengde acetat (%) i kulturmedium | | | | | |
|--|-------------|-----|------|------|----------------------|
| Lyssyklus | Tidspunkt | D1 | D2 | D3 | Gjennomsnitt (stdav) |
| 18:6 | Etter lys | 7,1 | 1,6 | 2,59 | 3,8 (2,9) |
| 18:6 | Etter mørke | 8,4 | 4,9 | 5,34 | 6,2 (1,9) |
| 24:0 | - | 5,3 | 5,03 | 8,4 | 6,3 (1,9) |

Vedlegg C: Medium og løsninger

Tabell C.1. f/4 medium i 100 % sjøvann

| Komponent | Innhold | Tilsetning til 1 L 100% sjøvann |
|--------------------------|---|---------------------------------|
| f/4 næringsmiddelløsning | <p>*NaNO₃ (53 g/L dH₂O)</p> <p>*APN (Fe (6%), Mn (2,4%), Zn (1,3%), B (1,1%), Cu (0,25%), Mo (0,25%)) (1,878 g/L dH₂O)</p> <p>*KH₂PO₄ (5,75 g/L dH₂O)</p> | 20 mL |

Tabell C.2. Walnes medium i 1L 100% sjøvann

| Stock | Innhold | Tilsetning til 1L 100% sjøvann |
|----------------|--|--------------------------------|
| A | <p>FeCl₃ 6H₂O (1,3g) MnCl₂ H₂O (0,36g) H₃BO₃ (33,6g) EDTA (dinatriumsalt) (45g) NaH₂PO₄ 2H₂O (20g) NaNO₃ (100g) dH₂O (1L)</p> | 1 mL |
| B | <p>ZnCl₂ CoCl₂ 6H₂O (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O CuSO₄ 5H₂O dH₂O (100mL)</p> | 1 mL |
| Vitaminløsning | <p>Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) (10mg) Vitamin B1 (Thiamin HCl) (10mg) Vitamin H (Biotin) (200 µg) dH₂O (100ml) (100mL)</p> | 0,1 mL |

Tabell C.3. Stamløsninger og tilsetningsmengde av karbonsubstrater til batch- kulturer av *P. tricornutum*.

| Karbonsubstrat | Stamløsning | Tilsetning til 300 mL kultur av <i>P. tricornutum</i> | | | | |
|--|----------------------------------|---|------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| | | Tilsetning 1 (10 %) | Tilsetning 2 (40 %) | Tilsetning 3 (50%) | Total (100 %) | Molar (g/L) |
| C₆H₁₂O₆ (D-Glukose) | 4,5 g/10mL MQ | 0,6mL | 2,4mL | 3mL | 6mL | 0,05 (9,01 g/L) |
| C₃H₈O₃ (Glyserol) | 1,25 g/mL | 0,22mL | 0,88mL | 1,1mL | 2,3mL | 0,1 (9,21 g/L) |
| C₂H₃NaO₂ (Natriumacetat) | 0,41 g/10mL dH ₂ O | 0,3mL | 1,2mL | 1,5mL | 3mL | 0,005 (0,41 g/L) |

Tabell C.4. Stamløsninger og tilsetningsmengde av karbonsubstrater til batch- kulturer av *I. galbana*.

| Karbonsubstrat | Stamløsning | Tilsetning til 300 mL kultur av <i>I. galbana</i> | | | | |
|--|----------------------------------|---|------------------------|-----------------------|------------------|----------------|
| | | Tilsetning 1 (10 %) | Tilsetning 2 (40 %) | Tilsetning 3 (50%) | Total (100 %) | Molar (g/L) |
| C₆H₁₂O₆ (D-Glukose) | 4,5 g/10mL dH ₂ O | 0,24mL | 0,96mL | 1,2mL | 2,4mL | 0,02 (3,6g/L) |
| C₃H₈O₃ (Glyserol) | 1,25 g/mL | 0,1mL | 0,44mL | 0,55mL | 1,1mL | 0,05 (4,6g/L) |
| C₂H₃NaO₂ (Natriumacetat) | 0,41 g/10mL dH ₂ O | 0,6mL | 2,4mL | 3mL | 6mL | 0,01 (0,82g/L) |

Tabell C.5. Stamløsning og tilsetningsmengde av acetat til kontinuerlige kulturer av *P. tricornutum*.

| Karbonsubstrat | Stamløsning | Tilsetning til 1L f/4 medium | Molar (g/L) |
|--|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| C₂H₃NaO₂ (Natriumacetat) | 0,205 g/5 ml dH ₂ O | 5 ml | 0,0025 (0,205g/L) |