

Bioetanol produktion från biomassa av marina mikroalger med jäst

Projektnummer 10-166, Slutrapport

Göteborg, 2012-12-25

Eva Albers

Inst. Kemi- och bioteknik – Industriell bioteknik

Chalmers tekniska högskola

Göteborg

Sammanfattning

Marina mikroalger med höga halter kolhydrater skulle kunna utgöra substrat för bioetanolproduktion med jäst efter hydrolys av algbiomassan för att frigöra fermenterbara socker. I detta projekt har vi försökt identifiera några kandidater av marina mikroalger med ett högt kolhydratinnehåll för en sådan applikation. Ett flertal arter valdes ut för initiala tester av kolhydratinnehållet. Några arter av *Rhinomonas*, *Rhodomonas*, *Porphyridium* och *Tetraselmis* uppvisade störst potential m.a.p. innehåll och tillväxthastighet. Dessa undersöktes i ett nästa steg hur variation av näringsämnen, kväve och fosfor, påverkade kolhydratinnehållet. Kvävet tillgänglighet hade störst inverkan för de undersökta arterna och framförallt *Tetraselmis* stam T_A ansamlade kolhydrater, vid överskott av kväve. I cellsuspensionen återfanns 0.33 g/l kolhydrater jämfört med 0.23 g/l för *Rhinomonas reticulata* och *Porphyridium cruentum*. Några extraktionsmetoder för att erhålla hydrolys av kolhydrater och få ut fermenterbara socker utvärderades. Biomassa av *Tetraselmis* kunde hydrolyseras på ett effektivt sätt med svagsyra, 3%, och värmebehandling 120 °C vid 1-1.5 timme. Monosackariderna, vilka främst var glukos och en mindre andel galaktos, frigjordes utan samtidigt bildning av inhibitorer. Fermentering med jäst av hydrolysaten var effektiv och etanol producerades med ett utbyte 0.41 g/g konsumerat socker (0.81 % av teoretiskt utbyte).

Summary

Marine microalgae with high content of carbohydrates could be provided as substrate for bioethanol production with yeast, after hydrolysis of the algal biomass to release fermentable sugars. In this project, we have worked on to identify some candidates of high carbohydrate containing marine microalgae for such application. Several species was selected for initial screening of the carbohydrate content. Some species of *Rhinomonas*, *Rhodomonas*, *Porphyridium* and *Tetraselmis* showed the best potential regarding content and growth rate. These species were investigated in the next step how nutrient variation, nitrogen and phosphorous, affected the carbohydrate content. The availability of nitrogen showed the largest influence on the species investigated and especially *Tetraselmis* strain T_A accumulated carbohydrates at nitrogen excess. In the full cell suspension 0.33 g/l carbohydrates were found as compared to 0.23 g/l for *Rhinomonas reticulata* and *Porphyridium cruentum*. Some different extraction methods were evaluated to obtain proper hydrolysis and release the fermentable sugars. Biomass of *Tetraselmis* could efficiently be hydrolysed with dilute acid at 3% and heat treatment at 120 °C for 1-1.5 hours. The monosaccharides, mainly glucose and to a lesser extent galactose, were released without formation of inhibitors. Fermentation with yeast of the hydrolysate was efficient and ethanol was produced with a yield of 0.41 g/g consumed sugars (0.81% of the theoretical yield).

Bakgrund

I en tid då användningen av fossila bränslen ifrågasätts kraftigt på grund av dess miljöpåverkan och dess begränsade tillgångar, finns det ett stort behov av utveckling av alternativa energikällor. I bioteknisk produktion av kemikalier, energi och material, med t.ex. bakterier eller jäst, krävs kol- och energikällor för tillväxt av celler. Oftast använder man olika sockerarter, främst glukos (druvsocker). Sockret fås i dagsläget från olika jordbruksprodukter som betor och sockerrör men finns även i form av stärkelse i potatis och spannmål och cellulosa i träråvara. På senare tid har det gjorts stora ansträngningar att använda stärkelse och framförallt cellulosa som bas för t.ex. produktion av bränsleetanol. Lantbruksgrödor har den nackdelen att de egentligen borde användas till matproduktion, medan träcellulosa medför andra problem av teknisk natur: trä måste förbehandlas, hydrolyseras för att bryta ner cellulosan så att t.ex. jäst i ett påföljande steg kan jäsa sockerarterna till etanol. Biomassa från odlade mikroalger är ett alternativ som har väckt stort intresse, eftersom odling av alger har flera fördelar i jämförelse med odling av landväxter för bioenergiutvinning.

Mikroalger använder olika typer makromolekyler för lagring av energi och näring; de kan producera både kolhydrater och lipider. Förutom som upplagsnäring kan kolhydrater i alger bygga upp cellväggen då oftast i form av cellulosa. Vid förhållanden med näringsbrist av t.ex. kväve och fosfor så kanaliseras cellerna sin metabolism till bildning av upplagsnäring. Genom att optimera förhållandena vid odling kan man alltså i viss mån styra cellinnehållet. Vid produktion av algbiomassa för energiframställning, är det fördelaktigt att odlingen sker på ett sådant sätt att bildningen av energirika molekyler främjas. I detta projekt har vi undersökt möjligheterna att använda lämpliga marina mikroalger, för att minska behovet av färskvatten för odlingarna, och producera en algbiomassa med ett högt innehåll av kolhydrater. Denna algbiomassa används sedan som råmaterial i bioetanolproduktion med jäst.

Resultat

För att nå huvudmålet i forskningsprojektet, att påvisa etanolproduktion från biomassa av mikroalger, har verksamheten i detta forskningsprojekt delats in i tre delar: 1) identifiering av algararter med högt kolhydratinnehåll, 2) identifiering av odlingsbetingelser som ger maximalt kolhydratinnehåll, och 3) utveckling av metoder för extraktion av algbiomassa och bioetanolproduktion. En del tid i projektet har även gått åt till att sätta upp analysmetoder för bestämning av cellulära komponenter, total protein och total halt neutrala lipider.

Identifiering av algararter med högt kolhydratinnehåll och snabb tillväxt

För produktion av algbiomassa till bioetanolproduktion behövs en lämplig art av mikroalg som innehåller mycket kolhydrater och som också är snabbväxande. Identifiering av ett antal sådana marina/salttoleranta algararter har genomförts genom en litteraturgenomgång (Razaghi, examensarbete) för att hitta lovande algararter bland prokaryoter, sk cyanobakterier och experiment med alger från relevanta grupper av eukaryota alger.

Flera cyanobakterier skulle kunna vara användbara då de utsöndrar ett mucushölje som till stor del består av kolhydrater. Flera icke-filamentösa cyanobakterier har ett förhållandevis tjockt mucuslager och skulle därför vara intressanta; däribland arter tillhörande *Gleoeothece*, *Gloecapsa*, *Cyanothece*, *Aphanothece*, *Aphanocapsa* och *Chroococcus*, vilka dessvärre inte gick att få tillgång till på ett enkelt sätt. Bland filamentösa cyanobakterier återfanns endast tre med ett dokumenterat högt kolhydratinnehåll, ca 30%; *Nostoc* sp., *Anabaena cylindrica* och *Phormidium angustissimum*. Av dessa valde vi att undersöka *Nostoc commune* experimentellt.

För eukaryota alger återfanns några arter med dokumenterat högt kolhydratinnehåll. Eftersom vi endast ville studera marina arter valde vi av dessa att studera vidare *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) vilken kan innehålla ca. 50% kolhydrater (Razaghi, examensarbete). Det är känt att vissa taxonomiska alggrupper använder stärkelse och stärkelseliknande ämnen som upplagsnäring¹ och dessa är intressanta för detta projekt; Rhodophyceae, Dinophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae, Charophyceae, och Prasinophyceae. Initialt valde vi att koncentrera oss på några av grupperna och införskaffade förutom *P. cruentum* från Rhodophyceae, 2 arter från Cryptophyceae, 2 arter från Chlorophyceae och 4 arter från Prasinophyceae. Initiala tester gjordes för att utesluta arter med för långsam tillväxt och identifiera arter med högt kolhydratinnehåll.

I den första omgången tester återfanns att de två Cryptophyceae arterna, *Rhodomonas* och *Rhinomonas*, och även Prasinophyceae arten *Tetraselmis* innehöll mycket kolhydrater jämfört med lipidalgen *Nannochloropsis* vilken har ett känt lågt innehåll av kolhydrater (Tabell 1). Alla dessa arter är intressanta att studera vidare kring effekt av näringsbegränsning och odlingsförhållanden för kolhydratbildningen. I den andra omgången tester (Razaghi, examensarbete) återfanns de högsta halterna av kolhydrater i *Porphyridium cruentum*, *Nostoc commune* och *Quadricoccus euryhalinicus* (Chlorophyceae) medan dålig tillväxt eller låga halter kolhydrater återfanns i *Nephroselmis minuta* (Prasinophyceae), *Mantoniella* sp. (Prasinophyceae), *Proteomonas sulcata* (Cryptophyceae), *Micromonas pussilla* (Prasinophyceae) och *Chlamydomonas euryale* (Chlorophyceae). Av dessa valdes *P. cruentum* ut för vidare studier kring effekt av näringsbegränsning eftersom *Quadricoccus* och *Nostoc* växte förhållandevis långsamt.

¹ South G.R. & Whittick A. Introduction to phycology. 1996. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK

Tabell 1. Specifik tillväxthastighet bestämd i 2 ml kulturer i 24 brunnars mikrotiterplattor med berikat havsvattensmedium, f/2² med lysrörsbelysning, 3000 lux i 12:12 h belysningscykler. Cellkoncentrationen bestämdes med *in vivo* fluorescens och tillväxthastigheten beräknades från lutningen av ln cellkoncentration mot tid under den linjära fasen och kolhydraterna med fenol-svavelsyrametod³. (Veide Vilg et al, manuscript)

Species	Specific growth rate (days ⁻¹)	Total carbohydrate content of biomass (µg/fluorescence unit)
<i>Rhodomonas salina</i> (Cryptophyceae)	0.90±0.49	1.1±0.2
<i>Rhinomonas reticulata</i> ⁴ (Cryptophyceae)	0.96±0.30	2.1±0.7
<i>Tetraselmis suecica</i> (Prasinophyceae)	1.28±0.67	3.6±1.4
<i>Nannochloropsis oculata</i> (Eustigmatophyceae)	0.71±0.09	0.15±0.02

Stammar av *Tetraselmis* som har isolerats från Indonesiska havsområden (Agus Suyono, tidigare arbete) utvärderades tillsammans med fem andra *Tetraselmis* stammar (av arterna *T. marina*, *T. chuii*, *T. striata*) från olika delar av världen. De isolerade stammarna artbestämdes genom sekvensering av ITS regionerna i anslutning till genen för 5.8s rRNA till att vara *T. chuii* för isolat från Ancol (T_A) och Manado (T_M) och *T. marina* för isolat från Cilegon (T_C). De indonesiska isolaten uppvisade en god tillväxt i batch-odlingar vilken även *T. striata* från Japan gjorde.

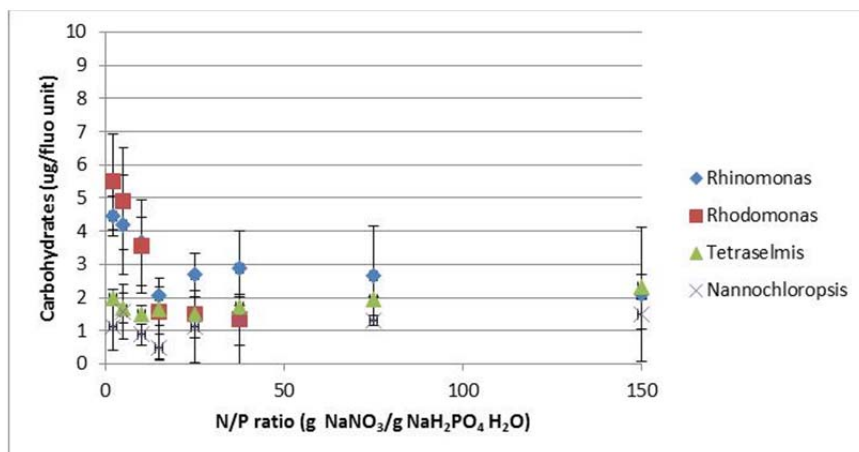
Identifiering av odlingsbetingelser som ger maximalt kolhydratinnehåll

För att inducera en kolhydratackumulering gjordes odlingar med olika halter av kväve och fosfor i mediet, genom att variera förhållandet mellan N och P, den s.k. N/P-kvoten. De olika N/P-kvoterna resulterar i förhållanden som ger en gradvis övergång från kväve- till fosforbegränsning, vilka inducerar ansamling av upplagringsnäring. Kolhydrater ansamlades i stor grad för både *Rhinomonas* och *Rhodomonas* vid kvävebegränsning medan lipidalgen *Nannochloropsis* uppvisade låga och konstanta halter vid alla N/P-kvoter (Figur 1). För *Tetraselmis suecica* sågs en förhållandevis måttlig ansamling av kolhydrater och de högsta nivåerna återfanns vid fosforbegränsning, d.v.s. höga N/P-kvoter (Figur 1).

² Guillard R.R., Ryther J.H., 1962, Can J Microbiol 8:229–239.

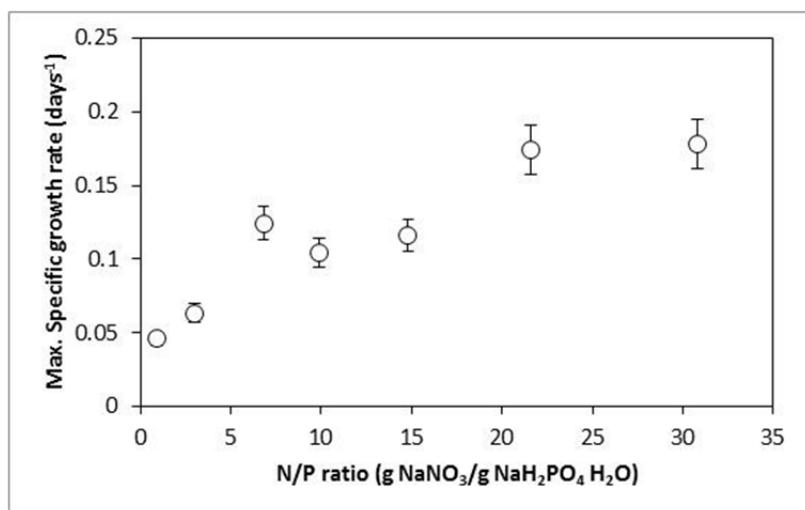
³ Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E., 1971. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.), Methods in Microbiol, vol. 5B. Academic Press, New York, pp. 244–249.

⁴ Rozo Sevilla V.X. 2009, Bachelor thesis, Chalmers University of Technology.



Figur 1. Totalt kolhydratinnehåll (μg glucose equivalent/fluorescens unit) i biommassan efter 7 dagar (2 ml kulturer) odlade med olika halter av kväve och fosfor, N/P-kvoter ($\text{g NaNO}_3/\text{g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i havsvattensmedium, f/2. Det normala mediet har en N/P-kvot vid 15 g/g. Odlingarna gjordes med 4 repetitioner av varje förhållande per platta och minst två mikrotiter plattor undersöktes. Cellkoncentrationen bestämdes med *in vivo* fluorescens.

Dessa experiment indikerade att den viktigaste faktorn för ökad kolhydratackumulering var tillgängligheten av kväve. Därför följdes *Porphyridium cruentum* i odlingar där fosforhalten var konstant i mediet medan N/P kvoten varierades för att ge begränsning kontra överskott av kväve (Razaghi, manuscript). Mängden tillgängligt kväve hade stor påverkan på tillväxthastigheten då kvävebrist kraftigt minskade tillväxten medan överskott av kväve gav en bättre tillväxt (Figur 2).



Figur 2. Maximal specifik tillväxthastighet (dagar^{-1}) från exponentiell fas i odlingar vid 7000 lux och 18:6 ljus:mörker cykler med havsvattensmedium, f/2, med 5 gånger högre halter av näringstillsetser (40 ml i 50 ml odlingsflaskor). Halten kväve varierades med konstant fosforhalt för att erhålla olika N/P-kvoter. Medelvärde och standard avvikelse från trippelodlingar visas.

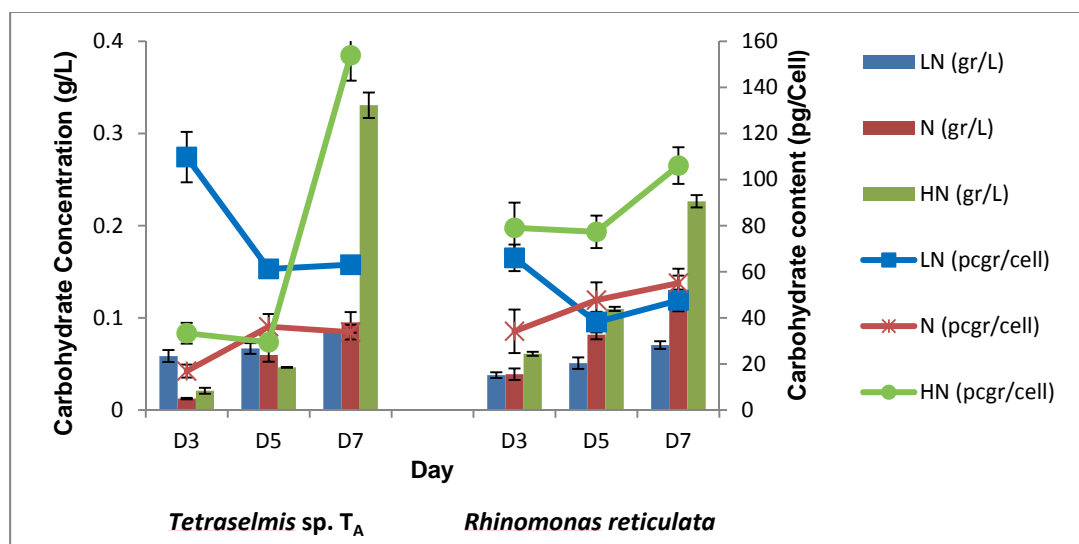
Den försämrade tillväxten resulterade i minskad mängd celler i stationärfasen medan det blev signifikant mer celler vid N/P-kvoter över 20 (Tabell 2). Trots att mängden kolhydrater var

högre vid större N/P-kvoter berodde detta endast på den större mängden celler, eftersom dessa inte ansamlade mer kolhydrater vid ett kväveöverskott. Däremot vid kvävebrist indikerade data en större ackumulering av kolhydrater i cellerna.

Tabell 2. Mängden celler och kolhydrater vid stationärfasen efter 5-10 dagar i odlingar vid 7000 lux och 18:6 ljus:mörker cykler med havsvattensmedium, f/2, med 5 gånger högre halter av näringstillsetser (150 ml i 250 ml odlingsflaskor). Halten kväve varierades med konstant fosforhalt för att erhålla olika N/P-kvoter. Medelvärde och standard avvikelse från trippelodlingar visas.

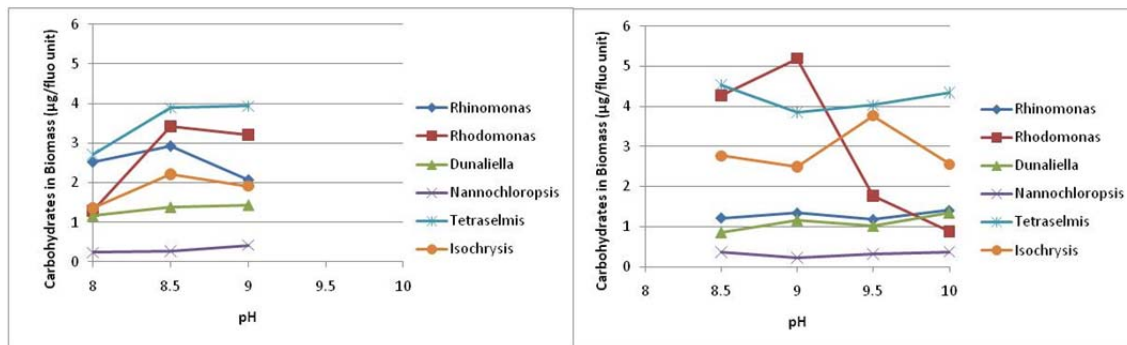
N:P-ratio (g/g)	Number of cells ($\times 10^8$ cells L^{-1})	Biomass concentration (g dw L^{-1})	Total carbohydrate concentration (g glc eq. L^{-1})	Carbohydrate content (g glc eq. g dw cells $^{-1}$)
1.0	2.8 \pm 0.8	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.004	0.40 \pm 0.14
3.0	32.7 \pm 5.5	0.47 \pm 0.10	0.15 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03
6.8	33.7 \pm 3.8	0.48 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03
9.9	29.9 \pm 3.9	0.51 \pm 0.06	0.13 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03
14.8	32.2 \pm 2.8	0.54 \pm 0.03	0.13 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02
21.6	59.4 \pm 3.3	1.18 \pm 0.08	0.22 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02
30.8	58.7 \pm 1.7	1.22 \pm 0.15	0.23 \pm 0.01	0.20 \pm 0.03

Möjligheten att påverka kolhydratproduktionen med variationer i kvävehalten undersöktes också för ett indonesiskt isolat, T_A, *Tetraselmis chuii* och *Rhinomonas reticulata*. För båda dessa arter uppvisade cellerna det högsta innehållet av kolhydrater i slutet av odlingarna med kväveöverskott, vilket resulterade i högre halter totala kolhydrater i cellsuspensionen för *Tetraselmis* T_A med 0.33 g/l (Figur 3) jämfört med 0.23 g/l för *Porphyridium* och *Rhinomonas*.



Figur 3. Kolhydratkoncentration i cellsuspension och cellulärt kolhydratinnehåll under odling i berikat havsvattensmedium, f/2, där halten kväve varierades med konstant fosforhalt för att erhålla olika N/P-kvoter (HN: 37.5 g/g, N: 15 g/g, LN: 5 g/g). Odlingarna gjordes vid 3000-4000 lux och 12:12 ljus:mörker cykler i kolvar med luftbubbling. Medelvärde och standard avvikelse från dubbelodlingar visas.

En annan faktor som kan påverka tillväxt och därmed cellsammansättningen är tillväxtmediets pH. Därför studerades tillväxt och kolhydratinnehåll i cellerna vid olika pH i buffrat odlingsmedium. *Rhodomonas* och *Tetraselmis suecica* uppvisade en stor effekt av pH på kolhydratansamlingen som var maximal kring pH 8.5-9.0 (Figur 4) medan tillväxthastigheten påverkades inte. Ett sådant pH är lite mer basiskt än naturligt havsvatten som har pH ca 8.4. Dessa resultat pekar på att ett optimalt odlings-pH för att erhålla maximal kolhydratackumulering bör ligga i intervallet 8.5-9, men är troligen beroende på vilken art som används.



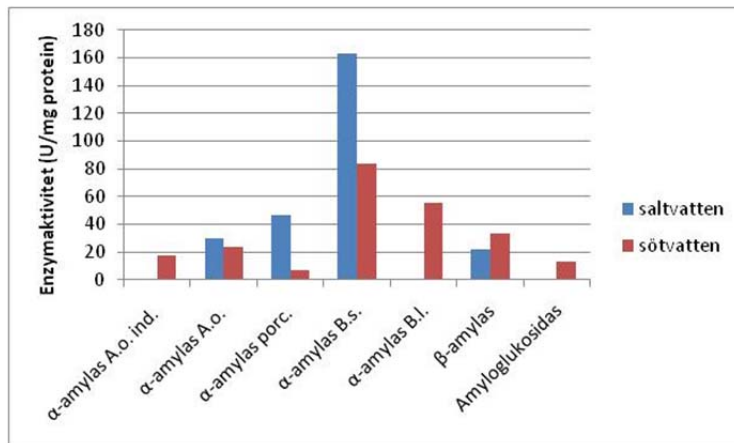
Figur 4. Totalt kolhydratinnehåll (μg glucose equivalent/fluorescens unit) i biomassen i slutet av odlingar bestämd i 2 ml kulturer med berikat havsvattensmedium, f/2, pH justerad med Tris-buffert (vänstra grafen) och Ches-buffert (högra grafen). Odlingarna gjordes med 4 repetitioner av varje förhållande per platta och minst två mikrotiter plattor undersöktes.

Av de arter vi hittills studerat har framför allt *Tetraselmis*, potential som producent av kolhydratrik algbiomassa. Denna art växte förhållandevist snabbt jämfört med *Rhinomonas* och *Porphyridium*, ansamlade kolhydrater vid övergången till stationärfas vilket resulterade i den högsta halten av kolhydrater i cellsuspensionen.

Extraktion av algbiomassa och bioetanol produktion

För att kunna använda algbiomassan som ett substrat vid jäsningen måste dess innehåll av kolhydrater brytas ner, hydrolyseras, till enskilda sockerarter. Denna hydrolys kan utföras kemiskt eller enzymatiskt. Stärkelse är den typ av kolhydrat för vilken det redan finns effektiva enzymssystem, vilka används kommersiellt i första generationens bioetanolproduktion. Olika typer av stärkelsenedbrytande enzym, amylaser, α -amylas, β -amylas och amyloglukosidas (glukoamylas), studerades initialt i detta projekt (Vimpari, examensarbete). Alla dessa enzym bryter α -1,4-glukosidbindningar på olika ställen i stärkelsen för att frigöra glukos och maltos. Vid en användning av algbiomassa från marina algar är det fördelaktigt att kunna använda enzymer som är aktiva i saltvatten då man inte måste avskilja saltet före hydrolyssteg. Vi ville därför jämföra aktiviteten i salt- och sötvatten för stärkelsenedbrytande enzym från olika källor, samt även för renframställda enzymer och preparationer för industriell användning. Vi fann att tre av våra enzympreparationer inte uppvisade någon aktivitet i saltvatten, α -amylas från *Aspergillus oryzae* (industriell preparation) och från *Bacillus licheniformis* samt amyloglukosidas från

Aspergillus niger (Figur 5). Däremot uppvisade α -amylas från bukspottskörtel hos gris och *Bacillus subtilis* båda en högre aktivitet i saltvatten än i sötvatten. Dessa resultat poängterar att det är viktigt att för en viss applikation välja rätt typ av enzympreparation som är aktivt vid rådande förhållanden.



Figur 5. Enzymaktivitet i salt- och sötvatten för olika typer av amylaser: α -amylas från *Aspergillus oryzae* (A.o., även industriell preparation, ind.), bukspottskörtel hos gris (porc.), *Bacillus subtilis* (B.s.), och *Bacillus licheniformis* (B.l.), samt β -amylas från korn och amyloglukosidas från *Aspergillus niger*.

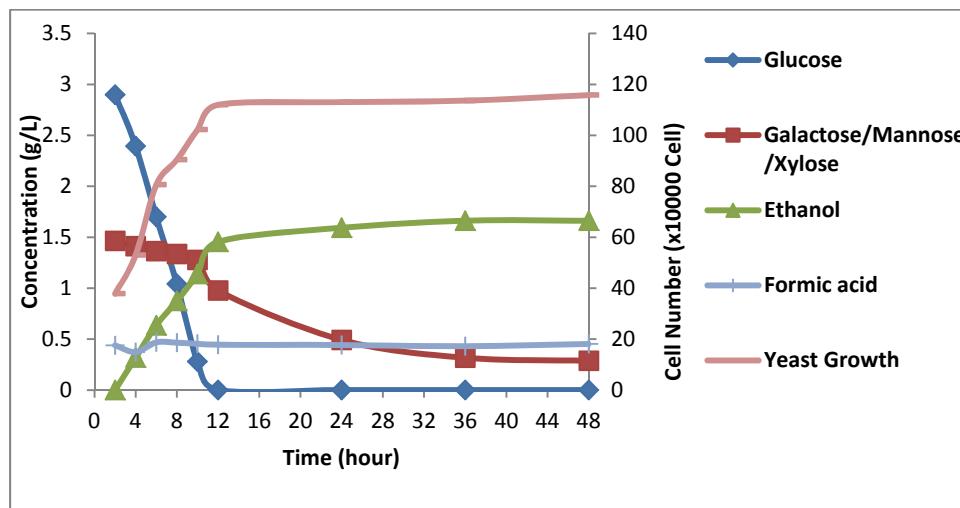
Biomassabaserade råmaterial innehåller normalt en blandning av flera sockerarter. Eftersom den vanliga jästen *Saccharomyces cerevisiae* normalt endast kan använda och omvandla C6 socker till etanol inte C5 socker så är monosackaridsammansättningen i algbiomassan viktig att bestämma. Kolhydraterna i biomassan från de olika *Tetraselmis* arterna som studerats i detta projekt bestod främst av C6 monosackarider, 95-99% (mättes med jonkromatografi efter syrahydrolys). Av dessa monosackarider var största delen glukos, 60-85%, en mindre andel galaktos, 10-35%, och mycket lite mannos, 1-5%. Därför kunde en standard industriellt använd jäststam, Ethanol Red, användas i detta projekt.

Extraktionsprocesser studerades först för biomassa av det indonesiska isolat av *Tetraselmis*, T_A, som uppvisat bra resultat i föregående experiment. För denna art är kolhydraterna främst cellulosaliknande eftersom enzym med cellulas och β -glukosidasaktiviteter kunde frigöra glukos vilket inte amylasenzym gjorde. Cellulosa har en kompakt struktur och därför behövs en förbehandling utföras för att öppna upp denna för enzymatisk behandling. En sådan gjordes med svagsyra behandling vid 100 °C under 60 minuter och tillsats av olika mängd enzym utvärderades. Den behandling som frigjorde mest glukos (53 % av cellulära kolhydraterna) var att använda 3 % svavelsyra i förbehandlingen och 10 μ l av vardera Celluclast och Novozyme 188 (cellulas och β -glukosidas preparationer från Novozyme).

Eftersom förhållandevis mycket kolhydrater inte frigjordes med denna behandling utfördes ytterligare hydrolysförsök vid högre temperatur (120 °C, 20 min i autoklav) med olika halter av svagsyra. Resultaten visade att det behövdes minst 3 % svavelsyra för att frigöra monosackariderna och en efterföljande behandling med cellulytiska enzym medgav ingen ytterligare ökning i sockerhalterna. Däremot om man förlängde värmebehandlingen upp till

1.5 h frigjordes ca 3 gånger mer socker än vid behandling under 20 min. Hydrolysat av *Tetraselmis* T_A biomassa innehöll låga nivåer av inhibitorer vilket är fördelaktigt för den efterföljande fermentationen: 0.1 g/l hydroxymetyl furfural och levulinsyra och inget furfural och något högre halt myrsyra vid ca 0.5 g/l.

Hydrolysat av *Tetraselmis* biomassa, stam T_A, var fermenterbart med jäst vilken konsumerade all glukos och det mesta av galaktosen (Figur 6). Etanol producerades med ett högt utbyte, 0.41 g etanol/g konsumerat socker, vilket är 81 % av det teoretiska etanolutbytet.



Figur 6. Etanol produktion med jäst från alghydrolysat av *Tetraselmis* T_A biomassa från odling med kväveöverskott (N/P- 37.5 g/g). Hydrolysatet var berikat med mineraler och vitaminer enl standard minimal medium för jäst⁵. Metaboliter analyserades med HPLC och BioRad kolon, Aminex HPX-87H, med vilken galaktos, mannos och xylos separeras i en gemensam topp i kromatogrammet.

Övriga resultat

Detta projekt har haft ett tvådelat syfte. Dels att genomföra ett forskningsprojekt kring bioetanolproduktion från mikroalger och dels att utveckla kontakterna och samarbete med den biologiska fakulteten vid Gadjah Mada universitetet i Yogyakarta, Indonesien. Chalmers har tidigare haft fina kontakter och utbyte med den kemiska/tekniska fakulteten vid Gadjah Mada och genom detta projekt så har denna kontakt utökats till andra delar av universitetet. Genom detta samarbete har doktoranden och universitetsläraren Eko Agus Suyono kunnat genomföra en del av sina doktorandstudier vid Chalmers som gästforskare. Han har jobbat från november 2010 t.o.m. maj 2012 i våra laboratorier på Chalmers med ett personligt stipendie från Erasmus Mundus EuroAsia programmet för att täcka sina levnadsomkostnader. Det har varit ett mycket lyckat samarbete som lett till att Eko fick en mängd data med sig hem som ska publiceras i minst två artiklar. Under 2011 har dessutom två examensarbetare, Silvana Vimpari och Ali Razaghi deltagit i vissa delar av projektet.

⁵ Verduyn et al. 1992. Yeast 8:501-517.

Publikationer från projektet

- S. Vimpari. **2011**. Amylasers enzymatiska aktivitet i saltvattensmiljö. Bachelor thesis, Chalmers University of Technology, Sweden.
- E. Agus Suyono, E. Albers. Hydrolysis of carbohydrates in marine *Tetraselmis* sp by acid and enzymatic pre-treatments to obtain substrate for ethanol production. Posterpresentation at Algae Cooperation Event, Trelleborg, Sweden, **2011** and Microalgae: Novel applications and frontlines, Göteborg, Sweden, **2011**
- A. Razaghi, A. Godhe, E. Albers. Screening microalgae for carbohydrate production, Posterpresentation at Algae Cooperation Event, Trelleborg, Sweden, **2011** and Microalgae: Novel applications and frontlines, Göteborg, Sweden, **2011**
- E. Agus Suyono, E. Albers. Bioethanol production from biomass of marine microalgae with yeast, Algae Biomass Summit, October 24-27, Minneapolis, USA, **2011**
- A. Razaghi. Screening of microalgae and optimization of medium N:P ratio for carbohydrate production. Master thesis, University of Gothenburg, Sweden, **2012**
- Culture optimality, phylogenetic analysis and bioethanol production from *Tetraselmis* spp using yeast, E. Agus Suyono, Mudasir, B. Setiyadi, D. Haryanti, Z. Guo, M. Bettiga, E. Albers, Poster exhibition of the department for Chemical and Biological Engineering at Chalmers and the Department of Chemistry and Molecular Biology at Göteborg University, **2012**
- A. Razaghi, A. Godhe, E. Albers. Effects of altered nitrogen levels in batch cultures of the red alga *Porphyridium cruentum* on growth and carbohydrate content, submitted to Centr. Europ. J Biol.
- E. Agus Suyono, B. Setiyadi Daryono, Haryanti, Mudasir, L. Pangabea, Z. Guo, E. Albers. Ethanol production from biomass of the microalgae *Tetraselmis* sp isolated from Ancol, Indonesia, manuscript in preparation
- J. Veide Vilg, X. Roza Sevilla, E. Albers. Effects of pH and nutrient limitations on cellular content of marine microalgae, manuscript in preparation