



EESTI MAAÜLIKOOL  
Metsandus- ja maehitusinstituut

Andrus Sillaots

**MIKROVETIKATE TOOTLIKKUSE JA  
RAKENDUSVALDKONDADE ANALÜÜS**

THE ANALYSIS OF PRODUCTIVITY AND  
APPLICATIONS OF MICROALGAE

Bakalaureusetöö

Loodusvarade kasutamise ja kaitse õppekava

Juhendaja: lektor Erkki Mäeorg, MSc

Tartu 2016

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Andrus Sillaots		Õppekava: Loodusvarade kasutamine ja kaitse	
Pealkiri: Mikrovetikate tootlikkuse ja rakendusvaldkondade analüüs			
Lehekülgi: 61	Jooniseid: 12	Tabeleid: 6	Lisasid: 4
Osakond: Metsakorraldus Uurimisvaldkond: Juhendaja: Erkki Mäeorg Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2016			
<p>Mikrovetikad on üsna laialdaselt leidnud kasutust toiduainetööstuses tänu väärtuslikele toitainete, vitamiinide ja pigmentide sisaldusele. Väärtuslike ühendite hulka kuuluvad muuhulgas olulised amino- ja rasvhapped, mida inimorganism ise ei suuda sünteesida. Vetikatest toodetakse toidulisandeid, funktsionaalseid toite ja teisi tervist etendavaid preparaate. Pigmentid on leidnud rakendust ka looduslike toiduvärvadena.</p> <p>Viimase poole sajandi jooksul on intensiivselt uuritud vetikaid ka biokütuste tootmiseks, kuna selles nähakse potentsiaali taastumatute kütuste täielikuks asendamiseks. Siiski on tänaseni tehnoloogiad liialt kallid, et see võiks konkureerida fossiilsete kütustega.</p> <p>Mikrovetikate kasvatamise peamine kitsaskoht ongi suur tootmiskulu. Kuna vetikate kontsentratsioon lahuses on väga väike, tuleb biomassi kättesaamiseks töödelda suurt hulka vedelikku mitmes etapis kallite tehnoloogiate abil.</p> <p>Mikrovetika saaduste konkurentsivõime tõstmiseks peaks väärima kõik biomassi komponendid, mitte keskenduma ainult ühele lõpp-produktile. Kulude vähendamise eesmärgil on tehtud esimesed sammud ka biomassi tootmise integreerimisel heitvee puhastamisega. Heitveed sisaldavad suures koguses toitaineid, mida on vaja vetikate kasvuks. Lisaks pole kasvukeskkonna jaoks tarvis kasutada magevett. Need on kaks olulist sisendit mikrovetikate kasvatamiseks. Teine positiivne aspekt seejuures on vee puhastamise efekt. Vetikate tootmise tõhususe kontekstis räägitakse ka uute ja paremate omadustega vetikaliikide leidmisest või olemasolevate geneetilisest arendamisest.</p>			
Märksõnad:			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor Thesis	
Author: Andrus Sillaots		Speciality:	
Title: The analyses of productivity and applications of microalgae			
Pages: 61	Figures: 12	Tables: 6	Appendixes: 4
Department: Field of research: Silviculture Supervisor: Erkki Mäeorg Place and date: Tartu 2016			
<p>Microalgae have successfully been used in food industry considering their valuable nutrients, vitamins and pigment. Essential compounds among others are important amino acids and fatty acids that can not be synthesized by human organism. The main products are food additives and nutraceuticals. Pigment are widely used as natural colorings. In last 50 years microalgae have been intensively investigated considering biofuels. It suppose to have the potential to replace the fossil fuels but until now the technologies are far too expensive to produce biofuels with competitive price.</p> <p>As the concentration of algal biomass is very low, to restore the biomass from a huge amount of liquid in different stages needs to be processed and all these technologies are expensive.</p> <p>Biorefinery is a keyword to make the microalgal products more competitive. It means all the compounds of microalgae should be used to produce a valuable goods. At the moment more common is to focus on one product which is irrational and expensive. Microalgae cultivation has nowadays also tried to integrate with sewage treatment. Domestic, agricultural and industrial sewage include a lot of nutrients like N and P which are exactly needed for biomass cultivation. In addition, no or less fresh water will be needed for cultivation. There are also genetical investigations to find new species or strains with better characteristics for autotrophic cultivation. Strains genetic engineering also seems to be a possibility.</p>			
Key words:			

# SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	6
1. MIKROVETIKATE ÜLDISELOOMUSTUS .....	7
1.1. Tootmisettevõtetes viljeletavad mikrovetikaliigid .....	9
1.1.1. <i>Chlorella</i> .....	9
1.1.2. <i>Dunaliella</i> .....	10
1.1.3. <i>Haematococcus</i> .....	11
1.1.4. <i>Botryococcus</i> .....	12
1.1.5. <i>Nannochloropsis</i> .....	13
1.1.6. <i>Aphanizomenon</i> .....	13
1.1.7. <i>Spirulina</i> .....	14
2. MIKROVETIKATE KASVUTINGIMUSED .....	16
2.1. Valgus ja fotosüntees .....	16
2.2. Temperatuur .....	19
2.3. Vesikeskkond .....	19
2.3.1. pH.....	20
2.3.2. Soolsus .....	20
2.4. Süsihappegaas .....	21
2.5. Toitained .....	22
2.5.1 Lämmastiku vaegus.....	23
3. KASVATUSTEHNOLOOGIAD .....	25
3.1. Avatud tiigid.....	25
3.2. Fotobioreaktorid.....	27
3.3. Saagi koristamine .....	28
3.3.1. Flokulatsioon ja filtratsioon .....	29
3.3.2. Dehüdratsioon .....	30
4. MIKROVETIKATE BIOMASSI SAAGIKUS JA KULU .....	31
5. MIKROVETIKATE RAKENDUSVALDKONNAD.....	35
5.1. Mikrovetikate kasutamine inimtoiduna.....	35
5.2. Mikrovetikatest biokütuste tootmine.....	38
5.3. Teised rakendusvaldkonnad .....	43

5.5. Probleemid ja võimalikud lahendused .....	44
KOKKUVÕTE.....	46
KASUTATUD KIRJANDUS .....	50
THE ANALYSIS OF PRODUCTIVITY AND APPLICATIONS OF MICROALGAE .....	55
Lisa 1. ....	57
Lisa 2.....	59
Lisa 3.....	60
Lisa 4.....	61

## SISSEJUHATUS

Vetikaid tuntakse kui üht vanimat eluvormi maal ning neid võib leida erinevates kliimavöötmes, soolastes ja mageveekogudes. Tänu oma lihtsale ehitusele on nad võimelised edukalt kohanduma erinevates keskkonnatingimustes. Vetikaid on kasutatud juba ammu ajast toiduks inimestele ja söödaks loomadele – juba 2000 aastat tagasi elati Hiinas üle näljaperiood, kasutades toiduks perekonna *Nostoc* vetikaliike (Spolaore *et al.* 2006).

Viimase poole sajandi jooksul on aga vetikate mass-tootmise vastu hakatud märksa suuremat huvi tundma, kuna need võiksid potentsiaalselt lahendada mitmeid olulisi probleeme, millega globaalsel tasandil silmitsi seistakse. Siiski on mikrovetikate kasvatamine suurtootmises kogu potentsiaali arvestades vähe arenenud. Sellest tulenevalt võib öelda, et bakalaureusetöö teemavalik on väga aktuaalne ning oluline ka globaalsel tasandil. Kasutades vetikaid inimeste hüvanguks, püütakse lahendada mitmeid olulisi probleeme, mis kaasnevad inimpopulatsiooni kasvu ja heaolustandardite suurenemisega.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on analüüsida mikrovetikate tootlikkust ja rakendusvaldkondi. Eesmärgi täitmiseks on püstitatud järgmised uurimisülesanded: 1) anda ülevaade mikrovetikate bioloogiast ja liigilistest eripäradest; 2) selgitada välja mikrovetikate kasvatusnõuded; 3) hinnata erinevaid kasvatustehnoloogiaid; 4) analüüsida mikrovetikate tootlikkust ja kasutusvaldkondade rakendatavust.

Töös kasutatud kirjandus on peamiselt inglisekeelne, kuna eestikeelset materjali antud teema kohta on väga vähe ning olemasolevad allikad liialt ülevaatlikud ega vasta teadusartikli nõuetele. Kasutatud allikate hulgas on nii ülevaate- kui ka tavateadusartikleid.

# 1. MIKROVETIKATE ÜLDISELOOMUSTUS

Vetikaid tuntakse kui ühte vanimat eluvormi maal. Need on primitiivsed taimed (tallofüüdid), s.t. ilma juurte, varte ja lehtedeta. Vetikate rakustruktuurid on peamiselt mõeldud energia muundamiseks ilma igasuguse arenguta väljaspool rakke ning nende lihtne areng lubab neil kohaneda valitsevate keskkonnatingimustega ja kasvada pikaajaliselt. (Brennan, Owende 2009) Vetikad ümbritsevad meid peaaegu kõikjal – nii mage- kui ka soolases vees, külmates mägijõgedes, soojas kliimas sisemaa soodes ja tiikides ning varieeruvad suuruselt mõnest mikromeetrist kuni üle 30 m pikkuste isenditeni. (Chair *et al.* 2009)

Vetikad klassifitseeritakse kahte rühma: makro- ja mikrovetikad. Makrovetikad on suured (mõõdetavad sentimeetrites), mitmerakulised ning neid võib tihti näha kasvamas tiikides. Mikrovetikad seevastu on väga väikesed (mõõdetavad mikromeetrites) ainuraksed vetikad, mis tavaliselt kasvavad veekogus hõljumina. Mikrovetika rakud võivad sobivates kasvutingimustes kahekordistuda mõne tunni jooksul. (*Ibid*)

Enamik mikrovetikaid on eukarüootsed rakud, s.t. omavad eristunud rakutuuma ja membraanseid rakuorganelle, mis kontrollivad rakkude funktsioone võimaldades neil ellu jääda ja paljuneda. Siiski leidub ka prokarüootseid mikrovetikaid, mille rakkudel puudub rakutuum ning neil pole membraanidest ümbritsetud organelle (plastiidid, mitokondrid, nukleiidid, Golgi kompleks ja flagella) sarnanedes rohkem bakteritele kui vetikatele – neid nimetatakse tsüanobakteriteks. (Brennan, Owende 2009)

Vetikaid jaotatakse hõimkondadesse peamiselt pigmentatsiooni, elutsükli ja baasrakustruktuuri alusel. Enam levinud on jaotus pigmentatsiooni alusel: *Chlorophyta* (rohevetikad), *Rhodophyta* (punavetikad), *Phaeophyta* (pruunvetikad) ja *Cyanophyta* (sinivetikad). (Morphology and Taxonomy)

Mikrovetikaid võib jagada veel autotroofseteks, heterotroofseteks ja miksotroofseteks:

- autotroofsed – enamik mikrovetikatest; vajavad kasvuks ainult anorgaanilisi ühendeid nagu CO<sub>2</sub>, soolad ja valgusenergia. Autotroofsetele vetikatele on fotosüntees võtmetähtsusega ellujäämiseks, mille abil nad muundavad päikesekiirguse ning

kloroplastidesse neeldunud CO<sub>2</sub> adenosiintrifosfaadiks (ATP) ja hapnikuks (O<sub>2</sub>), mida seejärel kasutatakse kasvu tagamiseks;

- heterotroofsed – mõned vetikaliigid, mis on võimelised kasvama pimeduses ja kasutama orgaanilist süsinikku (nagu glükoos või atsetaat) energia- ja süsinikuallikana;
- miksotroofsed – mikrovetikad, millel on võime teostada nii fotosünteesi kui ka omastada eksogeenseid orgaanilisi toitaineid. (Brennan, Owende 2009; Wen, Johnson 2009; Singh, Saxena 2015)

Mikrovetikad koosnevad peamiselt valkudest, rasvadest, süsivesikutest, vitamiinidest ja pigmentidest. Erinevate liikide kõrge proteiinisaldus ning võime sünteesida muuhulgas kaheksat aminohapet, mida inimorganism ise ei suuda toota, on üks peamisi põhjusi vetikate kasutamisel inimtoiduks. Vetikates leiduvad süsivesikud esinevad tärklise, glükoosi, suhkrute või teiste polüsahhariidide kujul. Nende seeduvus on väga kõrge kasutamaks toidus või söödas. Keskmise lipiidide sisaldus vetikarakus varieerub 1-70%-ni, kuid võib saavutada ka 90% sisalduse teatud kasvutingimustes. Rasvhapete hulka ja suhtelist proportsiooni on võimalik mõjutada toitainetega kasvukeskkonnas, näiteks lämmastiku vaegusega. Lipiidid koosnevad glütseroolist ja erinevatest küllastunud ja küllastumata rasvhapetest. Mikrovetikates on esindatud ka peaaegu kõik olulised vitamiinid: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, biotiin, foolhape ja pantoteenhape. Vitamiinide sisaldus suurendab vetikate toitainelist väärtust, kuid nende kogus sõltub vetikate kasvutingimustest, saagikoristusviisist ja biomassi kuivatamise meetodist. Samuti sisaldavad vetikad rikkalikult pigmente nagu klorofüll, karotenoidid ja fükobiliinid. (Spolaore *et al.* 2005)

Bishop ja Zubeck (2012) on välja toonud enamkasvatatavate mikrovetikate toitainelise koostise, mida kirjeldab tabel 1 (Bishop, Zubeck 2012).



**Tabel 1.** Enim kasvatatavate mikrovetikate toitaineline koosseis grammides 100g kuivaine (KA) kohta. (Bishop, Zubeck 2012)

	<i>Spirulina</i>	<i>Dunaliella</i>	<i>Haematococcus</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Aphanizomenon</i>
<b>Valgud</b>	63	7,4	23,6	64,5	1,0
<b>Rasvad</b>	4,3	7,0	13,8	10,0	3,0
<b>Süsivesikud</b>	17,8	29,7	38,0	15,0	23,0
<b>Klorofüll</b>	1,15	2,2	0,4 (punane) 1,1 (roheline)	5,0	1,8
<b>Beeta-karoteen</b>	0,12	1,6	0,054	0,086	0,42
<b>Vit. B<sub>1</sub> (tiamiin)</b>	0,001	0,0009	0,00047	0,0023	0,004
<b>Vit B<sub>2</sub> (riboflaviin)</b>	0,0045	0,0009	0,0017	0,005	0,0006
<b>Vit. B<sub>3</sub> (niatsiin)</b>	0,0149	0,001	0,0066	0,025	0,013
<b>Vit. B<sub>5</sub> (pantoteenhape)</b>	0,0013	0,0005	0,0014	0,0019	0,0008
<b>Vit. B<sub>6</sub> (püridoksiin)</b>	0,00096	0,0004	0,00036	0,0025	0,0013
<b>Vit. B<sub>9</sub> (foolhape)</b>	0,000027	0,00004	0,00029	0,0006	0,0001
<b>Vit. B<sub>12</sub> (kobalamiin)</b>	0,00016	0,000004	0,00012	0,000008	0,0006

## 1.1. Tootmisettevõtetes viljeletavad mikrovetikaliigid

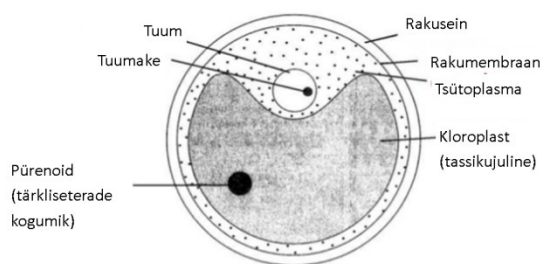
Ärilineel eesmärkidel kasvatatakse tootmisettevõtetes peamiselt järgnevaid mikrovetikate liike: *Chlorella*, *Dunaliella* ja *Haematococcus* (Heimann, Huerlimann 2015) *Botryococcus*, *Nannochloropsis* (Ho et al. 2014), *Spirulina* ja *Aphanizomenon* (Bishop, Zubeck 2012).

### 1.1.1. *Chlorella*

*Chlorella* on eukarüootne, *Chloropyhta* hõimkonda kuuluv, ainurakne rohevetikas, mida leidub paljudes veekogudes. *Chlorella* liigid on tootmises enim eelistatud, kuna need on kiirekasvulised, kasvutingimuste suhtes vähenõudlikud ning vastupidavad saastumisele. *Chlorella* erinevate tüvede hulgast on enim uuritud magevee tüve *Chlorella vulgaris*, seda peamiselt dieet-toiduainena. Masstootmises on seda viljeletud alates 1950ndatest ja seda toodavad maailmas rohkem kui 70 äriettevõtet. (Tahir 2014) USA, Jaapan, Hiina, Taiwan ja Indoneesia toodavad üle 2500 tonni kuivatatud *Chlorella* 't igal aastal (Bishop, Zubeck 2012). Enamik *C. vulgaris* 'e tööstuslikust biomassist on saadud miksotroofse viljelemise tulemusena toidulisandite tootmiseks. Uuringud *C. vulgaris* 'ega on läbi viidud peamiselt mageveekeskonnas, v.a. mõnede üksikute eranditega merevees. (Tahir 2014)

Magevees elutsev mikrovetikas *Chlorella vulgaris* (joonis 1) on mikroskoopilisel vaatlusel ümmargune, liikumatu reproduktiivne rakk suurusvahemikus 2-10 µm. Rakus on üks kloroplast, amüloosil ja amülopektiinil põhinev tärklisegraanul ning üks pürenoid, mis

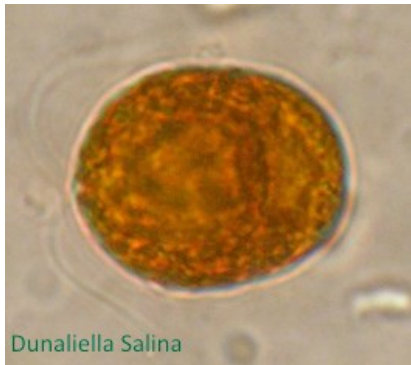
sisaldab suurel hulgal ribuloos-1,5-bifosfaat-karboksülaasi/oksügenaasi (RuBisCO – enim levinud valguline ühend maakeral, mis aitab siduda CO<sub>2</sub> fotosünteesi jaoks). Rakk paljuneb vegetatiivselt tootes 4 tütarrakku, mis vabanevad emaraku autospoor-rakust rebenemise teel. Rakusein areneb koos raku vanusega olles tugevam vanematel rakkudel, glükosamiini liitmine tagab rakuseina jäikuse. (Heimann, Huerlimann 2015)



**Joonis 1.** *Chlorella* rakuehitus (Protist Kingdom 2012)

### 1.1.2. *Dunaliella*

Merevees kasvav *Dunaliella* on eukarüootne mikrovetikas, mis kuulub *Chlorophyta* hõimkonda. Raku kuju ja suurus varieeruvad, kuid kuju on tüüpiliselt ovaalne (4-15 µm lai ja 6-25 µm pikk) heades kasvutingimustes, muutudes ümmarguseks ebasobivates keskkonnas. Enim viljeletav tüvi on *Dunaliella salina* (joonis 2), mille vegetatiivsetel rakkudel on kaks võrdse pikkusega niitjat viburit, mis võimaldavad neil ujuda. Rakk on nõ „alasti“, s.t. ilma rakuseinata, kuid ümbritsetud glükokaalüksist (suhkrurikas raku välispinna osa, mille moodustavad süsivesikud, glükoproteiinid, kuid mis pole väga kindlalt rakumembraaniga ühendatud). Rakud sisaldavad ka ühtainsat tassikujulist kloroplasti, mille keskmes on tärgliseteradest ümbritsetud pürenoid, membraaniga ümbritsetud tuuma, mitokondreid, vakuole ja Golgi kompleksi. Paljunemine toimub vegetatiivselt pikuti jagunemisel. Harva esineb ka suguline paljunemine isogaamse ühinemise teel (füsioloogiliselt ja biokeemiliselt erinevate rakkude osalemine viljastumisprotsessis). (Heimann, Huerlimann 2015; Tafreshi, Shariati 2009)



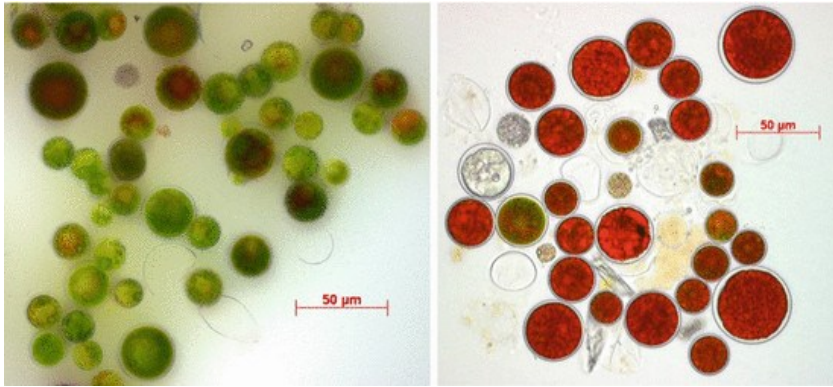
**Joonis 2.** *Dunaliella salina* rakk (Algalimento)

*Dunaliella* on võimeline elama väga kõrge soolsusega (kuni ~35%) vees - seda tuntakse kui kõige halotolerantsemat (soolsust taluv) eukarüooti. Sellises keskkonnas ei suuda enamik organisme ellu jääda ning seetõttu on antud mikrovetikatel väiksem risk saastumisele teiste konkureerivate mikroorganismide poolt, muutes selle kultiveerimise edukaks tootmisettevõtetes. Lisaks kõrgele soolsusele talub *D. salina* hästi ka kõrget valgusintensiivsust. (Tafreshi, Shariati 2009; Tempesta *et al.* 2010)

*Dunaliella*'t toodetakse hinnanguliselt 1 200 tonni kuivaines (KA) aastas. Suurimad tootmisettevõtted asuvad Iisraelis, Hiinas, USA-s ja Austraalias. *Dunaliella* toodab arvukalt karotenoide, millest levinuim on  $\beta$ -karoteen ja väiksemates kogustes ka  $\alpha$ -karoteeni, luteiini ja lükopeeni. (Bishop, Zubeck 2012)

### **1.1.3. *Haematococcus***

*Haematococcus* on eukarüootne ainurakne magevees kasvav vetikas kuuludes *Chlorophyta* hõimkonda. Rakud on biflagellaadid suurusega 8-50  $\mu\text{m}$  diameetrilt, liikuvast faasist pirnikujulised. (Heimann, Huerlimann 2015) Ebasobivates kasvutingimustes esineb raku palmelloidne vorm (joonis 3), s.t. rakud lähevad puhkestaadiumisse ja tõmbuvad limatsüsti ning hakkavad tootma selles olekus astaksantiini – antioksüdantse toimega karotenoidpigmenti, mis on toimelt vähemalt 10 korda tugevam kui  $\beta$ -karoteen ja 1000 korda efektiivsem kui vitamiin E. (Heimann, Huerlimann 2015; Bishop, Zubeck 2012)



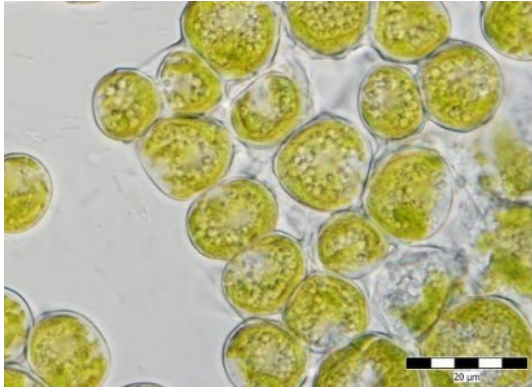
**Joonis 3.** *Haematococcus pluvialis*'e rakud palmelloidvormis – vasakul puhkestaadiumi alguses, kui astaksantiin hakkab kuhjuma ja paremal lõpustaadiumis tsüstidena sisaldades maksimaalset hulka astaksantiini, minimaalselt klorofüllit. (Solovchenko, Chekanov 2014)

Enim toodetakse tüve *Haematococcus pluvialis*, mis on levinud komponent funktsionaalses toidus, ravimites ja kosmeetilistes toodetes. *Haematococcus*'e kuivmassi toodetakse aastas hinnanguliselt 300 tonni USA-s, Indias ja Iisraelis. See on suurim loodusliku astaksantiini allikas moodustades 1,5-3% vetika kuivmassist. Astaksantiini hinnanguline ülemaailmne turg on 200 miljonit dollarit. Siiski 95% sellest turust tarbib sünteetiliselt toodetud astaksantiini. Selle kasutamiseks on arvukalt patente, peamiselt toiduaine- ja tervisetoodete valdkondades. *Haematococcus*'t kasvatatakse tootmisettevõtetes nii välitingimustes kui ka kontrollitud fotobioreaktorites. (Bishop, Zubeck 2012)

#### 1.1.4. *Botryococcus*

*Botryococcus* on hõljuv, kolooniaid moodustav vetikas (joonis 4), mis kuulub *Chlorophyta* hõimkonda. Tootmisettevõtetes enim rakendust leidnud tüvi on *Botryococcus braunii*. Selle 50-100 ovaalset rakku on põimitud keerulise süsivesinike ekstratsellulaarse maatriksi sisse. Kolooniad on ümbritsetud süsivesikutel põhineva tugiseinaga, mis koosneb arabinoosist ja galaktoosist, samal ajal kui rakusein on ümbritsetud tüüpilistest 1-1,4 ja b-1,3 polüsahhariididest. (Heimann, Huerlimann 2015)

*Botryococcus braunii*'l on keskmisest kõrgem (kuni 70%) lipiidide sisaldus ka tavapärastes keskkonnatingimustes, kuid selle liigi puhul on biomassi kahekordistumise aeg tavaliselt vahemikus 5-7 päeva (Mujtaba et al. 2012), mis on üsna aeglane võrreldes nt *Chlorella*'ga, mille biomass võib kahekordistuda mõne tunni jooksul.



**Joonis 4.** *Botryococcus braunii* vetikakoloonia. (*Botryococcus braunii* Kuetzing)

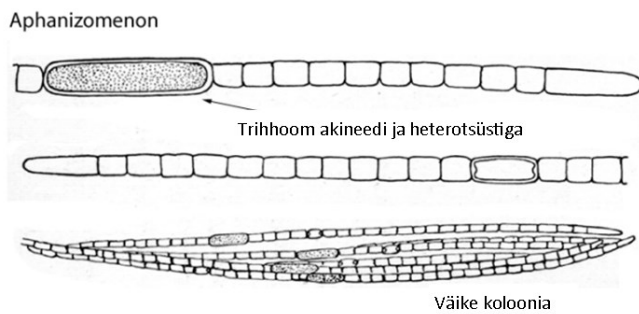
### 1.1.5. *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis oculata* kui üks enim kasvatatav mikrovetikas kuulub hõimkonda *Chlorophyta*. Erinevalt teistest mikrovetikatest sisaldab see liik ainult klorofüll a-d. Klorofüll b-d ja c-d *Nannochloropsis*'e rakkudes ei esine. Need vetikad on ainuraksed ja kasvavad nii merevees, magevees kui ka maapealses keskkonnas. *Nannochloropsis oculata*'t kasutatakse tihti veekultuuride elavtoiduna. Rakud on kujult ovaalsest ümmarguseni ning ei ületa diameetrit 5  $\mu\text{m}$ . Iseloomuliku papillaga, liikumatud rakud sisaldavad üksikut mitokondrit, Golgi kompleksi ja plastiidi, viimane neist koos ekstsentrilise pürenoidiga. (Heimann, Huerlimann 2015)

### 1.1.6. *Aphanizomenon*

*Aphanizomenon* on prokariootne tsüanobakter (sinivetikas), mida võib sageli kohata magevetes üle maailma (Bishop, Zubeck 2016). Vetikas on kujult niitjas ning moodustub kolme eritüüpi rakkudest (joonis 5) – vegetatiivsed rakud, mis vastutavad fotosünteesi ja paljunemise eest; heterotsüstid, mis fikseerivad õhulämmastikku, kus see muutub ammoniumiooniks; akineetid ehk spoorid, mis sisaldavad varuaineid (tsüanofütsiini, polüpeptiide ja tärklist), mis aitavad üleelada ebasoodsaid keskkonnatingimusi (mudasse settinult püsivad elusana aastaid). (Sinivetikad ehk tsüanobakterid)

Levinuim tüvi on *Aphanizomenon flos-aquae*, mis on võimeline elama ka jääga kaetud veekogus (tänu akineetidele) veetemperatuuril 2°C, nagu näitas uuring Saksamaal, Stechlini järves. Optimaalne kasvutemperatuur on siiski üle 20°C ning kasvukeskkonnaks on tihti eutrofeerunud veekogud, põhjustades seal nõ õitsemist (joonis 6). (Üveges *et al.* 2012)



**Joonis 5.** *Aphanizomenon*'i vetikaraku ehitus (Sinivetikad ehk tsüanobakterid)

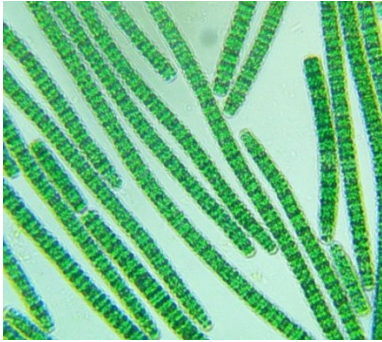


**Joonis 6.** *Aphanizomenon flos-aquae* poolt põhjustatud veekogu õitseng (Cyanobacteria Image Gallery)

### 1.1.7. *Spirulina*

*Arthrospira* ehk *Spirulina* on prokarüootne tsüanobakter, kuulub *Cyanophyta* hõimkonda ning tuntuim tüvi on *Spirulina platensis*. Rakud on diferentseerumata ja kiulised, pulga- või kettakujulised (joonis 7). Paljunemine toimub binaarse lõhustumise teel. (*Arthrospira platensis*)

*Spirulina* biomass koosneb 60-70% proteiinist (sealhulgas paljudest aminohapetest). Nende peamine fotosünteesiline pigment on fükotsüaniin, mis on värvilt sinine, kuid sisaldab ka klorofüll a-d ja karotenoide. Toidulisandite ja funktsionaalsete toitute seisukohalt on oluline ka vitamiin B, E ja  $\omega$ -6 rasvhapete sisaldus. (Bishop, Zubeck 2012)



**Joonis 7.** Mikrovetikas *Spirulina platensis* (Cyanobacteria Image Gallery)

*Spirulina*'t on toodetud juba üle 30 aasta. Aastas toodetakse ligikaudu 3000 tonni KA USA-s, Tais, Indias, Taivanis, Hiinas, Pakistanis ja Birmas. (Bishop, Zubeck 2012). Märkimisväärne osa tootmisest on koondunud Hiinasse ja Indiasse. Maailma suurim tootja Hiinas produtseerib aastas 200 tonni vetikapulbrit. (Spolaore *et al.* 2005) Tootmissüsteemina kasutatakse peamiselt spetsiifiliselt disainitud ringvoolukanaleid, kuid ka fotobioreaktoreid. (*Arthrospira platensis*)

## 2. MIKROVETIKATE KASVUTINGIMUSED

Biomassi tootmisel on vetikate kasv mõjutatud järgmistest teguritest: 1) keskkonnafaktorid, nagu valguskiirguse tase, temperatuur, soolsus ja pH; 2) keemilised faktorid, s.t. toitainete kvaliteet ja kvantiteet; 3) tootmistegurid (nt. lahjendatuse määr, segamine); 4) biotilised tegurid, s.t. reostumine mittesoovitavate liikidega (Tahir 2014; Algal Production)

Kõige optimaalsemad parameetrid, kuid ka talutavad vahemikud on liigispetsiifilised. Suurelt üldistades on olulisemad parameetrid toodud tabelis 2. Samuti võivad erinevad tegurid olla teineteisest sõltuvad ja parameeter, mis on optimaalne ühtedes tingimustes ei ole tingimata optimaalne teistes. (Algal Production)

**Tabel 2.** Üldistatud tingimused mikrovetikate kasvatamiseks (*Ibid*)

Parameeter	Vahemik	Optimum
Temperatuur C°	16-27	18-24
Soolsus (g/l)	12-40	20-24
pH	7-9	8,2-8,7

### 2.1. Valgus ja fotosüntees

Valgus on peamine faktor, mis mõjutab vetikate kasvu. Valguse olemasolu mõjutab otseselt vetikate tootmist sõltumata optimaalsest toitainete tasemest ja temperatuurist viljelemissüsteemis. Tõhus valguse ärakasutamine vetikate poolt sõltub rakukontsentratsioonist vetikalahuses, kultuuri tootmissüsteemi sügavusest ja raku pigmentilisest koostisest. Vetikakultuur on mõjutatud valgusintensiivsuse varieeruvusest ning valguse muutumisest ööpäevas ja hooajalistel tsüklitel. Samuti mõjutab kultuuri väga lühike valguse-pimeduse tsükel, s.t. murdosa-sekundi tsükel (vilkuva valguse efekt), mida mõnedel juhtudel tekitatakse segamise ajal. (Tahir 2014)

Grobbelaar (2013) on välja toonud tegurid, mis mõjutavad valgusenergia püüdmist vetikakultuuris (Grobbelaar 2013):

- valgusintensiivsus;
- valguse kvaliteedi ja spetsiifiliste lainepikkuste selektiivne neeldumine mikrovetikate biomassi poolt;
- valguse põrkumise nurk kultuuri pinnalt;



- kultuuri pinna seisund – nt. sile või laineline;
- kultuuri optiline tihedus (eeldades, et ainult vetikate mass summutab valgusenergiat);
- individuaalne rakkude liikumine läbi valgusgradiendi, mis on põhjustatud valguse summutamisest optiliselt tihedas kultuuris;
- kultuuri valguse aklimatsioon.

Fotosünteesi aparaadi põhiüksus on fotosüsteem. Valgusenergia, s.t. footonid, neelduvad läbi klorofüllil ja karotenoidi pigmentide fotosüsteemi antenna kompleksis. (Janssen 2002) Fotosünteesi efektiivsus (*photosynthetic efficiency* – PE) on valgusenergia osa, mis muundatakse keemiliseks energiaks fotoautotroofse kasvu käigus. Ainult fotosünteetiliselt aktiivse kiirguse (FAR) lainepikkustel 400-700 nm, mis esindab 42,3% kogu energiast valgusspektrumis, püütakse kinni. (Brennan, Owende 2009) Karotenoidi ja klorofüllil pigmentides esineb märkimisväärne erinevus: footonite neeldumise kõrgpunkt sagedusel 650-700 nm (punane ala) toimub klorofüllil abil. Karotenoidid, mida kutsutakse ka kaaspigmentideks, neelavad kõige tugevamalt sinises alas, 400-500 nm, ja kannavad ergastusenergia üle klorofüllidele, muutes fotosünteesi efektiivsust tõhusamaks erinevatel lainepikkustel. Siiski sellest vahemikust ülejäävatel lainepikkustel väike fotosünteetiline väärtus. (Janssen 2002)

Lisaks valguse absorbeerimisele on karotenoididel ka teine funktsioon rakus. Nad kaitsevad fotosüsteemi situatsioonis, kus vetikad on kõrge intensiivsusega päikesevalguse käes. Ergastatud energia üledoos võib viia toksiliste liikide tootmiseni, nt. monohapnik ning kahjustada fotosüsteemi. Lisaks klorofüllile ja karotenoididele on tsüanobakteritel pigmendid, mida kutsutakse fikobiliinideks. Need võimaldavad sinivetikatel absorbeerida üht osa spektrumist (600-650 nm) tugevamalt kui teised mikrovetikad. (Janssen 2002; Grobbelaar 2013)

Kinnipüütud energiat kasutatakse Calvini tsükliks, et toota süsivesinikke kasutades ära CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub>O molekule protsessis, mille saab kokku võtta reaktsioonivõrrandiga (Brennan, Owende 2009):  $6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2\text{O} + \text{footonid} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 + 6\text{H}_2$ .

Mikrovetikate fotosünteesiprotsess on palju lihtsam võrrelduna kõrgete taimedega ning väga hea footonite muundamise tõhusus võimaldab neil efektiivselt päikeseenergiat keemiliseks energiaks muuta. Valgusenergia muundamine toimub kahes etapis – need on valguse reaktsioon ja pimeduse reaktsioon. Valguse perioodil akumuleeritakse triglütseriide ja

pimeduse tsükli vältel kasutatakse neid rakkude kasvuks ja paljunemiseks. (Milano *et al.* 2016; Singh, Saxena 2015)

Kiirgusintensiivsus mängib olulist rolli fotosünteesis ja seega mõjutab tugevalt biomassi kasvu, CO<sub>2</sub> kasutamise määra ning raku koostist fotoautotroofsetel mikrovetikatel. Kiirgusintensiivsuse tasemed jaotatakse kolme kategooriasse – valguse piirang, valguse küllastatus ja valguse pärssimine:

- kasvava valgusintensiivsusega biomassi kontsentratsioon tootmissüsteemis suureneb, kuni teiste toitainete puudus seda ei piira;
- kui biomassi kontsentratsiooni hoitakse madalal, on võimalus saavutada spetsiifilise kasvumäära maksimumväärtus teatud kindlal valguse tasemel, mida tuntakse kui küllastatuse punkti;
- suurendades valgusintensiivsust üle küllastatuse taseme, võib see pärssida kasvu ning seda fenomeni nimetatakse fotoinhibitsiooniks. (Ho *et al.* 2014; Tahir 2014)

Eelnevast lähtuvalt on valguse kui ühe olulisima kasvufaktori peamine kitsaskoht madal fotosünteesi tõhusus kõrge valgusintensiivsuse juures. Intensiivses valguses neelavad vetikad pinnalt kuni 10 korda rohkem footoneid, kui nad suudavad kasutada fotosünteesiks, s.o. keskmiselt ~66% kadu päevas (Benemann, Polle 2012). Teoreetiliselt on vetikate maksimaalne fotosünteesi efektiivsus hinnanguliselt 13% kogu langevast valgusest, kuid praktikas on masskultuurides maksimumefektiivsus umbes 2,7% (Tahir 2014; Chisti 2012). Zhang *et al.* (2016) on välja toonud kõrgeima võimaliku energiakonversiooni tõhususe saadaval olevast päikeseenergiast triaglütserooliks (TAG), mis on umbes 9% - see on märksa madalam kui energia muundamise efektiivsus ränipõhistel päikesepaneelidel (420%). Vaatamata sellele, et mikrovetikad on tunduvalt produktiivsemad kui teised õlitaimed, ei ületa biomassi produktiivsus tootmisettevõtetes tavaliselt 22 g/m<sup>2</sup> päevas avatud tiigi süsteemis, mida loetakse kasumliku tootmise miinimumpiiriks. Valguse küllastus ja fotoinhibitsioon piiravad footonite neeldumist mikrovetikate viljelemise vältel. (Zhang *et al.* 2016) Mõnedes uuringutes on kasutatud vilkuva valguse efekti, et suurendada fotosünteesi tõhusust kuni väärtuseni 10% kasutades fooliumit keeriste tekitamiseks (Chisti 2012).

## 2.2. Temperatuur

Temperatuur on mikrovetikate viljelemisel üks olulisemaid faktoreid ja on korrelatsioonis kasvumääraga – reeglina võib saavutada kõrgemat kasvumäära suurendades temperatuuri optimaalsele tasemele. Temperatuuri variatsioonid mängivad samuti olulist rolli lipiidide ja süsivesikute akumulatsioonil paljude liikide puhul. (Ho *et al.* 2014) Optimaalne kasvutemperatuur varieerub vastavalt sellele, millised on liigi looduslikud elutingimused. Enamiku huviorbiidis olevate vetikate jaoks on optimaalne temperatuur vahemikus 24-40°C. Vetikad, kes kasvavad jõudsalt antud vahemikus võivad taluda ka madalat temperatuuri kuni 15°C, kuid kui temperatuur tõuseb 2-4°C üle optimaalse taseme, võib see viia kultuuri hävimiseni. (Tahir 2014)

Lipiidide sisalduse ja temperatuuri vahel on leitud erinevaid seoseid. James *et al.* (2013) viitas, et triglütserooli sisaldus *Chlamydomonas reinhardtii*'s on positiivses korrelatsioonis viljelemise temperatuuriga (James *et al.* 2013). Teine uuring näitas, et liigi *Desmodesmus* lipiidide sisaldus jääb stabiilseks temperatuuri vahemikus 25°C-40°C viidates, et geenide regulatsioon ja ensüümide aktiivsus, mis on kaasatud lipiidide biosünteesi ei ole tundlik temperatuuri muutustele selles vahemikus. (Ho<sup>a</sup> *et al.* 2014) Lipiidide sisaldus liikides *Monoraphidium*, *Nannochloropsis oculata* ja *Scenedesmus* väheneb, kui temperatuuri tõsteti vastavalt 25°C-lt 30°C-ni, 15°C-lt 20°C-ni ja 20°C-lt 30°C-ni. Seega kasvutemperatuuri mõju mikrovetikate lipiidide sisaldusele varieerub liigiti. Lipiidide kogunemiseks sobilik temperatuur pärsib tihti rakkude kasvu, mis lõppkokkuvõttes päädib madalama lipiidide produktiivsusega. (Ho *et al.* 2014)

Uuringutest temperatuuri ja süsivesikute akumulatsiooniseose vahel on leitud, et süsivesikute kogus *Chlorella vulgaris*'es kasvab 20-30% kui kultuuri temperatuuri vähendatakse 20°C-lt 5°C-ni. Ensüümid, mis on kaasatud süsivesikute sünteesi, on tuntud kui kultuuri temperatuuri mõjutajad. (Ho *et al.* 2014) Enamik uurijaid on siiski välja toonud, et temperatuuri mõju süsivesikute kogunemisel on ebaselge.

## 2.3. Vesikeskkond

Vesi on keskkond, milles mikrovetikaid enamasti viljeletakse (Tahir 2014). Vesikeskkonna olulised parameetrid vetikate kasvu jaoks on pH ja soolsus.

### 2.3.1. pH

Enamiku vetikaliikide jaoks on sobilik pH tase vahemikus 7-9, seejuures optimaalseks loetakse 8,2-8,7. *Dunaliella bardawil*'i kasvukeskkond on optimaalne pH 7,5 juures, samal ajal kui *Chlorella ellipsoidea* jaoks on see 10 (Khalil *et al.* 2010).

Keskkonna pH mõjutab paljusid bioloogilisi protsesse, mis on seotud mikrovetikate kasvu, metabolismi ja ioonide omastamisega. Kui kultuuri keskkonna pH-d tõsta, siis triglütseriidide sisaldus mõnede liikide puhul suureneb, aga see tuleneb järsu kasvumäära vähenemise hinnaga. (Ho *et al.* 2014) Santos *et al.* (2012) leidis, et kõrge pH mitte ainult ei suurenda lipiidide sisaldust, vaid parandab ka lipiidide kvaliteeti. Liigi *Neochloris oleoabundans* kasvatamisel kõrge pH-ga (nt pH 10) keskkonnas toodab vetikas peamiselt rasvhappeid, mis koosnevad palmitiinhappest (C16:0), steariinhappest (C18:0), oleiinhappest (C18:1) ja linoolhappest (C18:2), mis kõik on sobilikud biodiisli tootmiseks. (Santos *et al.* 2012)

Khalil *et al.* (2010) leidis, et süsivesikute sisaldus nii *Dunaliella bardawil*'s kui ka *Chlorella ellipsoidea*'s on korrelatsioonis biomassi kontsentratsiooniga viidates, et sobiva pH kasutamine võib märkimisväärselt parandada nii kasvumäära kui ka süsivesikute kogunemist nendes liikides. Maksimaalne süsivesikute sisaldus nende kahe organismi puhul avaldus pH tasemetel vastavalt 7,5 ja 9. (Khalil *et al.* 2010)

Kui sobilikku pH taset ei suudeta säilitada, võib see viia paljude rakuprotsesside häireteni ning lõppeda kultuuri hävimisega. Sobiv keskkonna pH saavutatakse kultuuri õhutamisega. Juhul kui vetikakultuur on suure tihedusega, võimaldab CO<sub>2</sub> lisamine korrigeerida suurenenud pH taset. (Algal Production)

### 2.3.2. Soolsus

Soolsus viitab merevee soolasusele ja seda määratletakse tavaliselt kui lahustunud soola hulka ühes kilogrammis vees. Keskmise merevee soolsus on 3,5% (35 g/L). Mageveevetikad ei suuda tihtipeale soolases vees kasvada, merevetikatele on soolsus aga oluline parameeter, mis mõjutab kasvu ja raku koosseisu. (Tahir 2014)

Sarnaselt teiste keskkonnateguritega mängib soolsus olulist rolli lipiidide ja süsivesikute akumulatsioonil mikrovetikates. Siiski kõrge soolsus võib ka aeglustada mõnede liikide kasvu, nagu *Chlorococcum* ja *Botryococcus braunii*. Kirjanduse allikatest võib leida, et

lipiidide ja süsivesikute kogunemine mikrovetikates kasvab vastusena vahetule soolsuse šokile. Näiteks suurendades NaCl kontsentratsiooni 0%-lt 2%-le liigi *Chlorococcum* 10-päevases viljelemistsükli, viib see suurenenud lipiidide sisaldusele 10,3%-lt 29,8%-ni. (Ho *et al.* 2014) Sarnaselt paraneb märkimisväärselt ka triglütseriidide (TAG) sisaldus mikrovetikates suurendades NaCl kontsentratsiooni. Veelgi enam, *Chlamydomonas reinhardtii* tärklise sisaldus, mida on viljelatud 100 mM (s.o. 5,85 g/L) NaCl keskkonnas, on 4 korda kõrgem kui jälgitud magevee viljelus (Siaut *et al.* 2011).

Merevesi täiendatud nitraatide, fosfaatväetiste ja mõnede teiste mikrotoitainetega on kasutusel tavapäraselt merekeskkonnas leiduvate mikrovetikate kasvatamiseks (Chisti 2007).

## 2.4. Süsihappegaas

Süsinikuallikas on samuti üks põhivajadustest mikrovetikate kasvamisel. Kõrgem süsiniku kontsentratsioon tagab kiirema kasvumäära ja kõrgema biomassi tootlikkusega, kuid seejuures on tendents pH taseme langemiseks viljelemiskeskkonnas, mis võib pärssida mikrovetikate kasvu. (Milano *et al.* 2016)

Süsinik kui peamine toitainet moodustab umbes 50% vetikate biomassi kaalust. Fotosünteesil põhineva vetikatootmise puhul on süsiniku allikaks tavaliselt CO<sub>2</sub>, mida manustatakse kasvukeskkonda, kas puhta süsihappegaasina või õhu/CO<sub>2</sub> seguna. Süsinik peab vormima kõik metaboolsed ühendid, sealhulgas DNA/RNA, süsivesikud, valgud ja rasvad. Hinnanguliselt kulub 1 kg biomassi tootmiseks 1,5-2 kg CO<sub>2</sub>. (Tahir 2014)

Üks avatud ringvoolukanali puudus seisneb selles, et osa CO<sub>2</sub> eraldub tagasi atmosfääri. See võib põhjustada tõsist majanduslikku kadu. CO<sub>2</sub> varustamiseks avatud süsteemis on välja pakutud erinevaid tehnilisi lahendusi, sealhulgas karboniseerimine või lahustunud karbonaatide lisamine. (Tahir 2014)

Taher *et al.* (2015) on läbi viinud uuringud *Chlorella*, *Pseudochlorococcum*'i ja *Nannochloropsis*'e liikidega, et määratleda optimaalsed tingimused lipiidide tootlikkuseks ja CO<sub>2</sub> sidumiseks. Katses uuriti optimaalset CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni, mis varieerus 0,04%-st 2%-ni erineva soolsusega vetes. Uuringu tulemusena selgus, et optimaalne CO<sub>2</sub> rikastamise määr oli 1%, mil *Chlorella*'l oli kõrgeim CO<sub>2</sub> sidumise määr 1,63 g/L päevas, sellele järgnes *Pseudochlorococcum* 1,24 g/L päevas ja *Nannochloropsis* 0,55 g/L päevas. (Taher *et al.* 2015)

## 2.5. Toitained

Lämmastiku kontsentratsioon ja süsiniku-lämmastiku suhe on samuti oluline määramaks vetikate kasvukiirust. (Milano *et al.* 2016)

Vetikad vajavad kasvamiseks toitained, mis oleksid ümbritsevast keskkonnast raku jaoks kergesti kättesaadavad. Vajalikud toitained jagatakse tavaliselt makro- ja mikrotoitaineteks. Esimesed neist on olulisimad ja nende defitsiit võib peatada vetikate kasvu. Võtmetähtsusega elemendid on lämmastik (N), fosfor (P) ja räni (S) ränivetikate jaoks (diaatomid, kes kasutavad seda rakuseina struktuuri ehitamiseks). Minimaalset toitainete vajadust võib hinnata kasutades ligikaudset mikrovetikate biomassi molekulaarset valemit, mis on  $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ . See valem baseerub andmetele, mis on esitatud Grobbelaar (2004) poolt. (Chisti 2007; Tahir 2014)

Lämmastikku on vetikate kasvuks vaja suhteliselt suurtes kogustes. Seda manustatakse tavaliselt nitraatide, ammooniumsoolade või karbamiidina (uurea). Lämmastikuvaru mõjutab kasvumäära, lipiidide koostist, rasvhapete koosseisu ja kultuuri üldist heaolu. Rakud omastavad lämmastikku, et toota klorofüllit, valke, nukleiinhappeid ja koensüüme. Lämmastiku omandamise tulemusena tõuseb keskkonna pH. Hinnanguliselt on tarvis 50-80 kg lämmastikku, et toota 1000 kg biomassi. (Tahir 2014)

Fosfor on samuti oluline vetikate ainevahetuseks, kuigi väiksema osakaaluga biomassis. Fosfori varu reguleerib mitmeid kasvuaspekte, biomassi koosseisu ja raku metaboolseid protsesse (nt energia ülekande fotosünteesi ajal, DNA ja nukleiinhapete süntees). Fosforit lisatakse keskkonda anorgaaniliste sooladena, tavaliselt ortofosfaadina ja selle kasutamine raku poolt on energiast sõltuv protsess. Vajalik energia saadakse läbi fotosünteesi või respiratsiooni. (Tahir 2014) Fosforit lisatakse kogumisse fosfaadina koos metalliioonidega. Selle hulk peab olema suurem miinimumvajadusest, kuna kogu lisatud fosfor ei ole rakkudele omastatav. (Chisti 2007)

Mikrotoitained on vaja väiksemates kogustes võrreldes makroelementidega, kuid need on siiski vajalikud vetikate kasvuks ja need osalevad metaboolsetes tegevustes. Vajalikud mikroelemendid on näiteks väävel, kaltsium, naatrium, kaalium, magneesium, raud, mangaan, tsink, vask ja koobalt. Nende mikrotoitainete piisav varu on vajalik kindlustamiseks kõrget biomassi saagikust. (Tahir 2014)

Käsitledes kasvumäära toitainete kontsentratsiooni funktsioonina, võib tuvastada neli peamist tsooni (Grobbelaar 2004):

- defitsiiditsoon – kus on madal toitainete kontsentratsioon ja kasv suureneb järsult, kui lisada toitaineid;
- üleminekutsoon, kus on kriitiline toitainete kontsentratsiooni piir ning selles tsoonis on kasv vähe mõjutatud lisanduvatest toitainetest (tihti viidatud ka kui optimaalsele kontsentratsioonile);
- piisava kontsentratsiooni tsoon, kus ei toimu kasvu suurenemist, kui lisatakse toitaineid (selles kontsentratsioonis leiab aset ladestumine);
- toksiline tsoon, kus toitainete kontsentratsiooni suurendamine viib kasvu pärssimiseni.

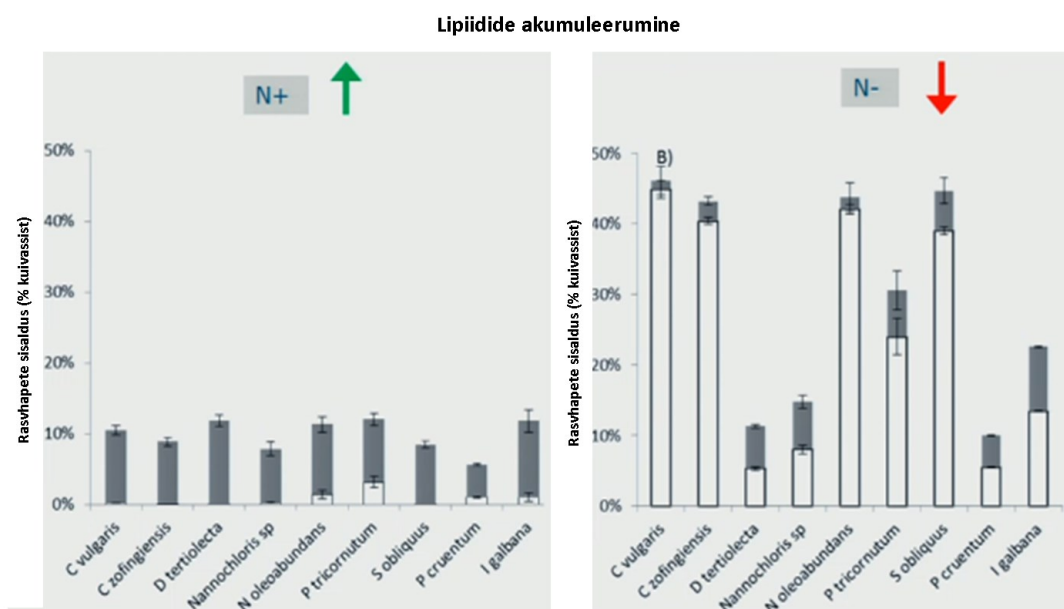
### 2.5.1 Lämmastiku vaegus

Optimaalne toitainete sisaldus kasvukeskkonnas tagab kõrgema biomassi kasvumäära, kuid lipiidide ja süsivesikute hulk biomassis võib seejuures jääda suhteliselt madalaks. Saavutamaks suuremat lipiidide akumulereerumist, kasutatakse sageli meetodina lämmastiku eemaldamist kasvukeskkonnast.

Kõigist makrotoitainetest viljeluskeskkonnas loetakse olulisimaks lämmastikuallikat lähtuvalt selle mõjust lipiidide ja süsivesikute akumulereerumisel mikrovetikates. Paljud uuringud on näidanud, et vetikad loovutavad oma süsinikumolekule energiarikastele lipiididele ja süsivesikutele, kui kasvukeskkonnas toimub lämmastiku ammendumine. Lämmastiku piirang võib esile kutsuda kiire kasvu mikrovetikate lipiidide/süsivesikute sisalduses, millega kaasneb proteiini ja klorofüllis sisalduse märgatav langus. See viitab vetikate võimele degradeerida klorofüllis ja proteiine, samal ajal muundades nende süsiniku skeletti lipiidideks ja süsivesikuteks lämmastikustressi kasvukeskkonnas. (Ho *et al.* 2014)

Ho *et al.* (2014) viljelesid liike *Scenedesmus obliquus* ja *Chlorella vulgaris* ning võrreldes optimaalsete keskkonnatingimustega esines lämmastiku eemaldamisel järsk kasv rakkude süsivesikute sisalduses vastavalt 21%-lt 49%-ni ja 15%-lt 51%-ni. (Ho *et al.* 2014)

Ka Wageningeni Ülikooli uuringud on näidanud mitmete vetikaliikide puhul arvestatavat tõusu rasvhapete hulga osas, kui eemaldada kasvukeskkonnast lämmastik (joonis 8). (Eppnik 2016)



**Joonis 8.** Lipiidide akumulereerumise võrdlus optimaalses ja lämmastikuvaeses kasvukeskkonnas. (Eppnik 2016)

Lämmastiku vaeguse tulemusena tootis *Chlamydomonas reinhardtii* triglütseriide, mis sisaldasid hulgaliselt palmitiin, oleiin- ja linoolhappeid, mis kuhjusid rakkude. Õlisüntees oli maksimaalne teisel-kolmandal päeval pärast N kahanemist miinimumini ja saavutas ühtlase taseme viiendal päeval. (Siaut *et al.* 2011) Mõnede mikrovetikate puhul viib lämmastikuvaene kasvukeskkond süsivesikute akumulereerumisele glükoosina, millest konverteeritakse bioetanooli läbi mikroobse fermentatsiooni. (Ho *et al.* 2013).



### 3. KASVATUSTEHNOLOOGIAD

Mikrovetikate kasvatussüsteemid jaotatakse avatud ja suletud süsteemideks sõltuvalt nende ehitusest. Esimesel juhul kasvatatakse mikrovetikaid avatud keskkonnas – kas madalas tiigis või ringvoolukanalis. Suletud süsteemis viljeletakse vetikaid läbipaistvate seintega anumates päikesevalguses või kunstlikus kiirguses. Mõlema süsteemi puhul on oluline (päikese)valgusega varustus, et saaks toimuda fotosüntees. (Milano *et al.* 2016) Arendatud on ka hübriidsüsteeme, kus vetikaid viljeletakse erinevas kasvufaasis avatud süsteemis ja fotobioreaktoris. Siiski pole need väga levinud ning seetõttu antud töös neid ei käsitleta.

#### 3.1. Avatud tiigid

Mikrovetikate viljelemiseks leidub erinevat tüüpi avatud tiike, sealhulgas looduslikud tiigid, kunstlikud ringvoolukanalid või ümmargused tiigid jne. Suurtootmises ainsana kasutusel olev avatud süsteem on ringvoolukanal (ing. k. *raceway pond*) (joonis 9) tänu biomassi kaubandusliku tootmise suuremale potentsiaalile sel viisil. Need tiigid on tavaliselt maksimaalselt 30 cm sügavad ning sõltuvalt maapinnast ehitatakse tiik kas kaevamise teel maa sisse või püstitatakse betoonist seinad maa peale. Suuremastaabilisi ringvoolukanaleid tutvustati esmakordselt 1950ndatel heitvee käitlemise eesmärgil. Edaspidi kasutati neid vetikate biomassi kaubanduslikuks tootmiseks peamiselt toiduainete ja funktsionaalsete toititude tootmiseks. (Tahir 2014)



**Joonis 9.** Ringvoolukanal (Microbioengineering)

Ringvoolukanalit opereeritakse päevavalguse tundidel katkematu vee ja toitainete varustamisega. Vetikamassi tsirkuleeritakse tavaliselt sõurattaga, mis on end kõige paremini õigustanud erinevate segamismeetodite hulgast (teised variandid veel õhusilla pump, propellerid, veejoad) kui odav ning suhteliselt madala energiakuluga lahendus. Sõurattaga loksutamise eesmärgiks on hoida rakke hõljumises ja vältida nende settimist, suurendades seeläbi vetikate CO<sub>2</sub> kasutamist atmosfäärist. Hoolikalt kontrollitud parameetrid nagu pH ja teised keskkonnatingimused lubavad ära kasutada 90% keskkonda viidud CO<sub>2</sub>-st. Osa CO<sub>2</sub> jäätmeid saab taaskasutada ka mullistades need tagasi tiiki. Tiik on madal, et võimaldada maksimaalset päikesevalgusega varustatust – päikesevalgus põrkub pinnale ja absorbeeritakse kultuuri sees. Kui vett ja toitaineid lisatakse sõuratta eest, siis küpsed mikrovetikad eemaldatakse tiigi teises otsas, sõuratta taga. (Tahir 2014; Janssen 2002; Chisti 2007)

Avatud tiigi süsteemid on biomassi produktiivsusest vähem efektiivsed kui fotobioreaktorid. See tuleneb mitmetest teguritest – sealhulgas vee aurumine, CO<sub>2</sub> defitsiit, temperatuuri kõikumised kasvukeskkonnas, ebaefektiivne kultuuri segamine ning ööpäevased valgusepimeduse tsüklid. Kokkuvõttes on avatud süsteemides keeruline kontrollida ümbritsevaid keskkonnatingimusi. (Milano *et al.* 2016; Brennan, Owende 2010) Vee kadu läbi aurumise tuleb kompenseerida värske vee lisamisega, mis suurendab tootmiskulusid. Kuigi ringvoolukanalid on avatud atmosfäärile, võib fotosünteesi käigus toodetud hapniku eraldumine olla raskendatud. Samuti on probleemiks reostus läbi avatud pinna. (Tahir 2014; Chisti 2007)

Avatud tiik on vaatamata oma puudustele väga edukas kontseptsioon tänu oma lihtsusele ja madalatele kuludele. Siiski saab sellistes avatud keskkondades kasvatada vaid teatud liiki mikrovetikaid nagu mõned kiiresti kasvavad *Chlorella* tüved, *Spirulina platensis* tugevalt aluselises vees, *Dunaliella salina* kõrge soolsusega vees ning *Haematococcus*. Nende kõrgeim biomassi tootlikkuse määr on 60-100 mg/L/päevas KA. (Milano *et al.* 2016; Tahir 2014) Et kasvatada selliseid monokultuure pikendatud ajaperioodi jooksul, peaks kasutama suletud fotobioreaktoreid, ennetamaks keskkonna saastumist teiste mikroorganismidega. (Janssen 2002)

Tootmisettevõtetes kasutatakse tänasel päeval enim avatud tiigi süsteeme odavamate kapitali ja opereerimiskulude tõttu. Sellest lähtuvalt nähakse neis lühiperspektiivis ka suuremat potentsiaali mikrovetikate kasvatamisel tootmisettevõtetes ja erinevate saaduste

tootmisel. Vaatamata mainitud puudustele ja ohtudele on nende süsteemide võimsused hetkel märksa suuremad, kui järgnevalt käsitletavatel fotobioreaktoritel. Maailma suurim ringvoolukanali tootmissüsteem on 440 000 m<sup>2</sup>, mis kuulub ettevõttele Earthrise Nutritionalis ning toodab tsüanobakterite biomassi toiduks (Spolaore et al., 2006).

### 3.2. Fotobioreaktorid

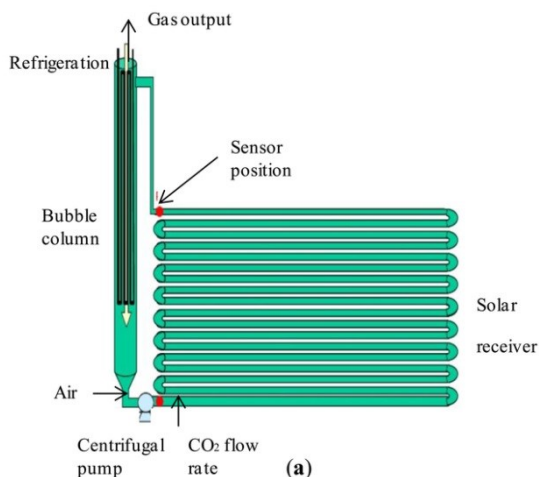
Fotobioreaktorite tehnoloogia on loodud ületamaks probleeme, mis on seotud avatud tiigi süsteemiga. Suletud süsteeme on mitut tüüpi, sealhulgas torujad ja plaatjad fotobioreaktorid. Fotobioreaktori algne disain oli plaatjas, mida tihti kasutatakse uuringutes tänu selle suurele pinnalale ja maksimaalsele päikseenergia neeldumisele. Fotobioreaktori baasehitus sisaldab sirgeid klaasimassiive või plastiktorusid. Plaadikujulist reaktorit võib ümber seadistada horisontaalsesse, vertikaalsesse, kaldus asendisse, et tagada optimaalne päikesevalguse juurdepääs. (Milano *et al.* 2016)

Fotobioreaktorid lubavad viljeleda mikrovetikate monokultuure pikema perioodi jooksul kui avatud tiikides ja on võimelised tootma suuremat hulka biomassi. Need süsteemid on praktilisemad ja tootlikumad vetikate viljelemiseks tänu võimalusele kontrollida efektiivselt keskkonnatingimusi (pH, temperatuur, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon jne) ning kordades väiksemale saastumisriskile. (Milano *et al.* 2016) Suletud tootmissüsteemi kasutamise olulisus suureneb veelgi, kui eksisteerib võimalus parandada vetikatüvesid kasutades geneetilist muundamist (Janssen 2002).

Enim kasutatav torujas fotobioreaktor (joonis 10) koosneb sirgete läbipaistvate torude massiivist, mis on tavaliselt valmistatud plastikust või klaasist. Selles massiivis ehk päikesekollektoris toimub päikesevalguse püüdmine. Päikesekollektorid on tavaliselt diameetriga 0,1 m või isegi väiksemad, et tagada maksimaalne valguse läbipääs tihedas lahuses ning seeläbi kõrge biomassi tootlikkus. Vetikapuljong tsirkuleeritakse veehoidlast/degaseerimise torust päikesekollektorisse ja tagasi. (Chisti 2007) Kultuuri tsirkuleeritakse katkematult kasutades õhusilla või mehaanilist pumpa.

Kui vetikapuljong on läbinud päikesekollektori, on fotosünteesi tulemusena toodetud hapnikku. See eraldatakse reaktorist degaseerimise toru kaudu uude ringlusesse sattumist. (Dormido *et al.* 2014) Kõrge kiirgusintensiivsuse juures võib maksimum hapniku tootmine olla kuni 10 g/m<sup>3</sup>/min. Lahustunud hapniku tase, mis on palju suurem õhu küllastatuse väärtusest, pärsib fotosünteesi (Molina Grima *et al.* 2001) ning

kombinatsioonis intensiivse päikesevalgusega põhjustab fotooksüdatiivset kahju rakkudele. Et ennetada inhibitsiooni ja kahjustusi, ei tohiks lahustunud hapniku tase ületada 400% õhu küllastuse väärtusest. (Chisti 2007)



**Joonis 10.** Toruja fotobioreaktori tootmisprotsess skemaatiliselt. (Dormido *et al.* 2014)

Puhast CO<sub>2</sub> lisatakse süsteemi tsentrifugaalse pumba abil degaseerimise tsoonis. Vajalikud võivad olla ka lisanduvad CO<sub>2</sub> lisamise punktid teatud vahemike järel, et ennetada süsiniku piirangut ning samal ajal hoida kontrolli all pH taset. Jahtuvat vett pumbatakse läbi soojusvaheti, et tagada ühtlane keskkonna temperatuur. (Dormido *et al.* 2014; Chisti 2007)

Fotobioreaktorite kasutamise peamine takistus on selle kõrge kapitalikulu, nii rajatiste loomiseks, kui ka opereerimiseks ja hoolduseks. Kuid lisaks sellele on fotobioreaktoritega seotud ka teisi väljakutseid nagu ühtlaselt võrdse vetikavoo tagamine pikkades torudes; hüdrodünaamiline stress, mis võib viia rakkude hävimiseni; eelpool mainitud hapniku akumulatsioon, kui see vaatamata degaseerimise püüdlustele jääb siiski ringlusse. (Tahir 2014; Chisti 2007)

### 3.3. Saagi koristamine

Koristamise protsess on tavaliselt kulukas ja see moodustab umbes 20-30% kogu biokütuste tootmiskulust. Seega on oluline valida sobiv koristamise meetod, et minimeerida üldkulusid. Koristamise viis sõltub suuresti mikrovetikate tüübist, rakkude tihedusest ja soovitud lõpp-produktist. Saagikoristuse protsessi võib jagada kahte etappi : esimeses etapis on põhiosa koristamine, kus biomass eraldatakse üldkultuurist tavaliselt flokulatsiooni või ka flotatsiooni või settimise teel. Teises etapis on eesmärgiks

konsentreerida biomassi lahus tsentrifuugimise ja filtreerimise tehnoloogia teel. Neid kahte protsessi kutsutakse paksendamiseks. Biomassi taastamine vedelikust võib olla märkimisväärne probleem tänu vetikaraku väiksusele (3-30 µm diameetrilt). Vetikapuljong on tavaliselt suhteliselt lahjendatud (<0.5 kg/m<sup>3</sup> kuivas biomassis tööstuslikes tootmissüsteemides) ning seega on vaja biomassi kättesaamiseks töödelda suurt hulka vedelikku. (Milano *et al.* 2016; Molina Grima *et al.* 2003)

### 3.3.1. Flokulatsioon ja filtratsioon

Flokulatsiooni protsessi eesmärgiks on kiirendada mikrovetikate liitmist ja settimist. Mikrovetikate rakud kannavad tavaliselt negatiivset laengut, mis ei luba neil ise liituda suspensioonis. Keemiliste flokulantidega nagu multivalentesed katioonid ja katioonsed polümeerid, neutraliseerivad flokulandid negatiivse laengu mikrovetikates, mis põhjustab nende liitumise ja kiirendab settimise määra. Flokulandid, mida peamiselt kasutatakse, on raudkloriid, raudsulfaat, alumiiniumsulfaat ning teised orgaanilised soolad. Täiskasvanud mikrovetikate puhul toimub autoflokulatsioon, kui neid hoitakse jätkuvalt päikesevalguse käes väiksema CO<sub>2</sub> varustamisega. Suuremahulise tootmise puhul on selline meetod soodsam ning koristamise kogukulud vähenevad oluliselt võrreldes tavalise flokulatsiooniga. (Molina Grima *et al.* 2003; Milano *et al.* 2016)

Gravitatsioonilise settimise meetod on leidnud kasutust suure tihedusega mikrovetikate nagu *Spirulina*, *Botryococcus*, *C. vulgaris*, ja *Scenedesmus* biomassi koristamisel. (Milano *et al.* 2016)

Filtreerimise protsessis voolab vetikapuljong läbi filtrite, mis peavad kinni mikrovetikad ja lasevad ainult veel läbi filtri voolata. Filtreerimise tüüpe on erinevaid – mikrofiltreerimine, vaakumfiltreerimine, rõhuga filtreerimine, ultrafiltreerimine, tangentsiaalvoolu filtreerimine (TFF). Tavaline filtreerimine (mikrofiltreerimine) ja vaakumfiltreerimine on sobilikud suurtele mikrovetikatele, mis on suuremad kui 70 µm nagu näiteks *Spirulina* ja *Coelastrum*, kuid pole sobilik mikrovetikatele, mis on suuruselt väiksemad kui 30 µm nagu näiteks *Scenedesmus*, *Chlorella* ja *Dunaliella*. Väiksema suurusega mikrovetikate puhul on soovitatav kasutada membraan-mikrofiltreerimist ja ultrafiltratsiooni, kus mõlemad filtreerimise meetodid nõuavad madalat trans-membraani survet ja madalaid ristvoolukiiruse tingimusi. Mikrofiltreerimise membraani poori suurus jääb vahemikku 0,1-1 µm, samal ajal kui ultrafiltratsiooni membraan on väiksema poori suurusega vahemikus 0,001-0,1 µm. TFF meetod on tuntud oma suure tõhususe poolest ja seda kasutatakse

eraldamiseks lahuses sisalduvaid viiruseid, baktereid ja muud rakulist materjali. TFF kasutamisel mikrovetikate filtreerimises on tõestatud, et umbes 70-80% mikrovetikatest on võimelised taastuma säilitades raku struktuuri, omadused, liikuvuse. Peamine takistav tegur TFF kasutamisel on kõrge kulu, mis on vajalik membraani asendamiseks ja seda tuleb vahetada väga tihedalt suuremahulises tootmises. (Milano *et al.* 2016)

Vee sisaldus mikrovetikate lahuses on alati kõrgem kui 98%. Kuna mikrovetikate rakkude tihedus on sarnane veega ja rakkudel on raske koaguleeruda (nagu näiteks bakterid), on endiselt probleemiks saagi efektiivne koristamine. (Zhang *et al.* 2016)

### **3.3.2. Dehüdratsioon**

Dehüdratsioon on kohene protsess pärast koristamist, mis on oluline kuivatatud biomassi tootmiseks. Kasutatavad kuivatamise meetodid on tavaliselt päikese kuivatamine, madala survega riiuli kuivatamine, pihustamine, trummelkuivatamine, keevkihi kuivatamine, sublimatsioonkuivatus (lüofiliseeritud) ja valgusmurduvus akna tehnoloogia kuivatamine. Kulutused päikese kuivatamisele on madalaimad kõigi veetustamise meetodite hulgast, kuid see nõuab suurt pindala ja on väga ajakulukas. Teised meetodid on tõhusamad, kuid toovad kaasa suuri kulusid dehüdreerimisele, eriti suurtootmises. (Milano *et al.* 2016)

Pärast kuivatamist toimub saadud biomassi töötlemisprotsess vastavalt soovitud lõpp-produktile. Lisas 1 on toodud mikrovetikatest biomassi tootmise skeem ning võimalikud lõpp-tooted vetikate biomassist.

## 4. MIKROVETIKATE BIOMASSI SAAGIKUS JA KULU

Läbi aastate on uuritud tuhandeid vetikaliike eesmärgiga leida kõrge lipiidide sisaldusega tüvesid. Õlirikas mikroorganism suudab toota ja säilitada märkimisväärse hulga triglütseriide erinevate stressifaktorite mõju all. Kõige õlirikamad liigid kuuluvad peamiselt hõimkondadesse *Chlorophyta* (rohevetikad) ja *Cyanophyta* (tsüanobakterid). Tüüpiliselt on õlirikastes kultuurides keskmine lipiidide sisaldus ~27% biomassi KA optimaalsetes kasvutingimustes ning ~44% biomassi KA teatud stressifaktori mõjuga keskkonnatingimustes kasvanud vetikatel. Siiski ei ole lipiidide sisaldus ainus kriteerium, mille alusel valida liiki õlitootmiseks, kuna õli sisaldus ei võta arvesse selleks kuluvat aega. Parem kriteerium on lipiidide tootlikkus. Teised aspektid, mida arvesse võtta on kasvatamise, saagikoristamise ja ekstraheerimise lihtsus. Kui liik on valitud, tuleb tootmisprotsess optimeerida maksimaalsele õli tootlikkusele. (Tahir 2014)

Majanduslikult on mikrovetikate tootmise puhul oluline kõrge biomassi tootlikkus ja lipiidide sisaldus, mida on aga üheaegselt keeruline saavutada, kuna tingimused, mis soosivad kõrget biomassi tootlikkust põhjustavad madalat lipiidide akumulatsiooni ja vastupidi. (Taher *et al.* 2015)

Mõnede mikrovetika liikide lipiidide sisaldus võib olla 50-70% kuivmassist, kuid nende liikide kasv on tavapäraselt aeglane. Kõige tuntum näide lipiidide rikkast liigist on *Botryococcus braunii*, mis võib akumulatsiooniga lipiide isegi üle 70% KA, kuid selle liigi puhul on biomassi kahekordistumise aeg tavaliselt vahemikus 5-7 päeva. Alternatiivina kasutatakse tihti *Chlorella* ja *Scenedesmus* liike, tänu nende kasvukiirusele ja lihtsamatele kasvatustehnoloogiatele. Siiski on *Chlorella* lipiidide sisaldus vaid 14-30% autotroofsetes kasvutingimustes toitaineterikkas keskkonnas. See lipiidide sisaldus ei ole piisav kommertsiaalseks biodiisli tootmiseks. (Mujtaba *et al.* 2012)

Alternatiivina fototroofsele viljelemisele avatud ja suletud süsteemides, on esile kerkinud ka heterotroofne kasvatussüsteem. Liang *et al.* (2009) leiab, et see viljelusviis aitab mikrovetikate tootmist kuluefektiivsemaks muuta. Heterotroofse viljelemise puhul on orgaaniliseks süsinikuallikaks suhkrud või orgaanilised happed ning biomassi

tootmine ei sõltu valgusest, mistõttu saavutatakse paremaid tulemusi vetikakontsentratsioonis ja õlisisalduses. Näiteks rohevetikas *Chlorella protothecoides* on näidanud heterotroofsetes tingimustes 3-4 korda kõrgemat vetikate kontsentratsiooni lahuses (15,5 g/L) kui autotroofselt viljelusel ja õli sisalduse suurenemist 4,2 korda (>50% kuivmassis). Siiski on heterotroofselt viljelemisel orgaanilise süsiniku allikas suur kuluartikkel võrreldes teiste lisatavate toitainetega. Selle ületamiseks tuleks leida odav süsinikuallikas – toorglütserool, mida saadakse biodiisli tootmise protsessist, võiks olla üks lahendus. (Liang *et al.* 2009)

*Chlorella vulgaris*'el on miksotroofsed omadused, s.t. see on võimaline kasvama ka heterotroofsetes tingimustes. *C. vulgaris* on näidanud kõrgemat kasvumäära keskkonnas, kuhu lisatud glükoosi või atsetaati. 12-päevases tootmistsükli oli raku kasvumäär vastavalt 7 (glükoosiga) ja 9 (atsetaadiga) korda kõrgem võrreldes autotroofse viljelusega. Kõrgeim lipiidide sisaldus saavutati autotroofselt viljelemisel lämmastikuvaeses keskkonnas, kuid kõrgeim lipiidide tootlikkus (54 mg/L päevas) oli vetikamassi kasvatamisel 1% glükoosiga kasvukeskkonnas. (Lian *et al.* 2009)

*Nannochloropsis*'t viljeleti välitingimustes lämmastiku vaeguses suvisel ajal 590-liitrisel, 10x1m *Green Wall Panel*-is (vt. lisa 2). Kontrollgrupp toitainete piisava kultuuriga kasvatati väiksemas *Green Wall Panel*-is, mis oli samuti välitingimustes, et tagada võrdlus standard biomassiga. Viljelemiseks kasutati tehislükku merevett soolsusega 30g/L kohta, kuhu oli lisatud Guillard'i f toitelahuse (Algae Production) toitaineid ilma lämmastiku allikata. (Bondioli *et al.* 2012)

Eesmärgiks oli saavutada kõrge lipiidide sisaldus. Biokütuste tootmiseks on võtmetähtsusega ka akumulunud lipiidide koostis. *Nannochloropsis* nagu ka teised õlised vetikad, mida kasvatatakse piisavas toitainete keskkonnas, toodavad peamiselt polaarseid lipiide, mida ei ole võimalik töödelda biokütusteks. Biodiisli tootmiseks on vaja neutraalset õli, mis koosneb peamiselt triglütseriididest (TAG) ja osaliselt glütseriididest, mida on lihtsasti võimalik muundada vastavalt rasvhappe metüülestriks (fatty acid methyl esters – FAME). (Bondioli *et al.* 2012)

Katse tulemusena selgus, et lämmastiku vaeguse tulemusel kasvas lipiidide sisaldus kultuuris 68,5%-ni KA ja neutraalsete lipiidide sisaldus kasvas 70%-ni kogu lipiidide hulgest (48% biomassi KA). Polarsete lipiidide hulk kahanes vastavalt 26%-lt 19%-ni. (Bondioli *et al.*



2012) Sarnaselt on leidnud ka Suen *et al.* (1987) katses *Nannochloropsis*'ega: lämmastiku vaeguse tingimustes saavutas liik lipiidide sisalduse 55% (võrrelduna 24-30% lämmastiku külluses kasvanud kultuuriga), millest peamised lipiidid olid triglütseriidid (79%). Sellele järgnesid polaarsed lipiidid (9%) ning süsivesinikud (2,5%) kogu lipiidide hulgast. (Suen *et al.* 1987)

Jimenez *et al.* (2003) viis läbi uuringud *Spirulina platensis* 'ega Hispaania lõunaosas Malagas. Uuringu tulemusena leiti, et *Spirulina* masstootmine avatud tiigi süsteemis on teostatav vastavalt Lõuna-Hispaania kliimatingimustele üheksal kuul aastas, märtsist novembrini. Potentsiaalne keskmine biomassi tootlikkus sellele perioodil on 10,3 g KA/m<sup>2</sup> päevas. Aasta keskmine tootlikkus on ligikaudu 8,2 g KA/m<sup>2</sup> päevas, mis tähendaks biomassi saagikust 30 tonni/ha aastas. Antud tulemused on 450 m<sup>2</sup> suurusest ja 0,3 m sügavast avatud ringvoolukanali süsteemist. (Jimenez *et al.* 2003)

Vetikate tootmine ringvoolukanalis võib olla partii-põhine, katkematu või osaliselt katkematu protsess. Ühe partii tootmine ringvoolukanalis kestab 4-6 nädalat ning maksimaalne biomassi tootlikkus on 0,05-0,1 g/L päevas. 13 kuud osaliselt katkematu viljelusprotsessiga on keskmine biomassi tootlikkus 0,19 g/L päevas ning katkematu viljelusprotsessiga on saavutatud biomassi tootlikkuse määrasid 0,204 g/L päevas. Katkematu ja poolkatkematu süsteem on eelistatud suurtootmises, kuna see võimaldab kultuuri pikaajalist kasvatamist. (Tahir 2014)

Hinnanguline kulu ühe kilogrammi mikrovetikate biomassi KA tootmiseks on 2,95 \$ fotobioreaktoris ja 3,80 \$ avatud ringvoolukanalis. See hinnang põhineb eeldusel, et kasutatav süsihappegaas on kättesaadav tasuta. Kui aastane biomassi tootmisvõimsus suureneb 10 000 tonnini, väheneb tootmiskulu kilogrammi kohta ligikaudu 0,47 \$ ja 0,60 \$ vastavalt fotobioreaktoris ja ringvoolukanalis tootmisel tänu mastaabisäästule. (Tahir 2014) Antud arvutused aga ei võta arvesse kapitali investeeringuid.

Mikrovetikate kasvatamiseks on vaja vett, valguskiirgust, CO<sub>2</sub>, toitaineid ning energiat optimaalse kasvutemperatuuri hoidmisele, mille hulk praeguste hindade ja tootmismahdade juures ei ole kasumlik. Võttes arvesse kogu kasvatustsüklit, siis on sisendina panustatud energia investeeringutasuvuse (energy return on investment – EROI) väärtus mikrovetikate bioenergiast umbes 0,13-1,77. See on üsna ebaatraktiivne, kui võrdluseks on fossiilse õli EROI tavapäraselt 11-18. Tänu kõrgele ressursside

tarbimisele ja madalale energiaväljundile, jääb mikrovetikatest biodiisli hind 10 korda kõrgemaks kui fossiilsel diisli. Lisaks on mikrovetikate monokultuuris kalduvus reostusele soovimatute kahjurite ja patogeenide poolt, mis omakorda suurendab majanduslikku riski suurtootmise puhul. (Zhang *et al.* 2016)

## 5. MIKROVETIKATE RAKENDUSVALDKONNAD

Mikrovetikad on tänapäeval üsna laialdaselt kasutust leidnud toidulisandite ja farmaatsiatoodete tööstuses. Lisaks hinnatakse neid kõrge toiteväärtusega toiduna. Suurt potentsiaali nähakse mikrovetikate biomassist biokütuste tootmises, mis võimaliku toodetava biomassi koguse poolest võiks olla üks alternatiividest naftal põhinevatele mootorikütustele. Samuti on energiajulgeoleku tagamiseks aktuaalne vetikate biomassist soojus- ja elektrienergia tootmine asendamaks ammenduvaid fossiilseid kütuseid. Lisaks nendele suurtele valdkondadele, räägitakse mikrovetikatest veel heitvee puhastamise, atmosfääris CO<sub>2</sub> vähendamise kontekstis. Järgnevas peatükis käsitletakse mikrovetikate erinevate rakendusvaldkondade hetkeseisu.

### 5.1. Mikrovetikate kasutamine inimtoiduna

Vetikaid on kasutatud sajandeid inimeste toiduks, kuid nüüdisajal viljeletakse neid märksa intensiivsemalt. Vetikate roll inimese tervises ja toitumises on suurenev käsikäes uuringutega nende kasulikkusest ning vetikate efektiivsemast viljelemisest. Praegusel ajal toodetavaid vetikaid kasutatakse peamiselt toidus, toidulisandites, funktsionaalsetes toitudes, loomasöötades ja värvainetes. Inimeste tarbeks kasvatatavad vetikaliigid on vaid väike hulk kõigist liikidest ning neis sisalduvate ühendite uurimine on alles lapsekingades, kuigi arvukalt kasulikke tooteid on turule juba tulnud. (Bishop, Zubeck 2012).

Toiduainetööstuses on rakendust leidnud peamiselt *Arthrospira (Spirulina)*, *Aphanizomenon*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* ja *Haematococcus* (Spolaore et al. 2005).

Erinevate mikrovetikate proteiini sisaldus jääb vahemikku 28% (*Porphyridium cruentum*) kuni 71% (*Spirulina maxima*) KA. Võrreldes neid väärtusi inimeste poolt tavapäraselt tarbitavate toiduainetega (väikseim sisaldus 8% riisis, suurim 43% lihas) võib käsitleda mikrovetikaid väärtusliku valgusallikana. *Spirulina platensis*'t on märgitud kui kõrge proteiinisaldusega vetikat. Vetikate baas-aminohapete koostises on isoleutsiin, leutsiin, lüsiin, metioniin jne. Neid aminohappeid võib leida ka liikides *Chlorella*, *Dunaliella* ja *Tetraselmis*. (Klein, Buchholz 2013) *Chlorella* proteiin sisaldab kõiki kaheksat asendamatu aminohapet, mida inimese organism ise ei suuda sünteesida. (Bishop, Zubeck 2012)

Paljude vetikaliikide kasutegur seisneb ka väärtuslike rasvhapete sisalduses, mida kasutatakse laialdaselt toidulisandites ning loomasööda komponendina. (Chair *et al.* 2009) On hästi teada, et inimorganism vajab olulisi polüküllastumata rasvhappeid  $\omega$ -3 ja  $\omega$ -6, kuid ei suuda neid ise sünteesida. Inimorganismi võimetust neid rasvhappeid sünteesida seostatakse mitmete haigustega, kuid ka vananemise, suitsetamise ja alkoholi tarbimisega.  $\omega$ -3 ja  $\omega$ -6 rasvhapped on olulised kudede jaoks, et taaselustada nahka ja vältida enneaegset vananemist (suur kasutusvaldkond kosmeetikatööstuses), kuid ka immuunsüsteemi tugevdamiseks ja ka kudede taastumise protsessideks. (Jesus Raposo *et al.* 2013)

Pika ahelaga polüküllastumata rasvhapped on üks kategooria võimalikest mikrovetikasaadustest. Spetsiifiline rasvhape eikosapentaehape (EPA) omab märkimisväärset mõju näiteks veresoonkonnale tänu oma trombivastasele toimele. Samuti on osades mikrovetikates leiduv rasvhape dokosaheksaehape (DHA) dominantne rasvhape neuroloogilistes kudedes, s.t. inimaju hallolluses. (Janssen 2002) EPA ja DHA mängivad olulist rolli ka lipiidide sisalduse vähendamises ning omavad põletikuvastast toimet. (*Ibid*)

Vetikad on rikkad paljude vitamiinide, sealhulgas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> ja C poolest. (Chair *et al.* 2009) *Spirulina* perekonna liike (nt *Arthrospira*) tuntakse kui väga head vitamiinide allikat. Sellest vetikast toodetud vitamiin A on uuringute põhjal tõhusam ning inimorganismile paremini omastatav võrreldes sünteetiliselt toodetuga. Ka teised mikrovetikad nagu *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* ja *Chlorella stigmatophora* on rikkalikud vitamiinide allikad, sisaldades kõrgemas või sarnases kontsentratsioonis vitamiine nagu apelsinid. (Klein, Buchholz 2013) Enim toodetud vetikate vitamiinisisaldus on toodud ka esimeses peatükis tabelis 1.

Vetikatest saadavad pigmendid on olulised funktsionaalse toidu ja toidulisandite komponendid, kus kasutatakse ära nende antioksidantseid omadusi, kuid rakendatakse ka värvainetena. Mikrovetikates sisalduvad peamised pigmendid on  $\beta$ -karoteen, astaksantiin, fükotsüaniin ja klorofüll.

$\beta$ -karoteeni toodetakse peamiselt liigist *Dunaliella* paljude ettevõtete poolt üle maailma – Iisraelis, Hiinas, USA-s ja Austraalias. Hinnanguline *Dunaliella* tootmismahd aastas on 1200 tonni KA. Erinevate allikate põhjal võib  $\beta$ -karoteeni hulk antud vetikaliigis ulatuda kuni 14%-ni kuivaines. Ka *Spirulina platensis* on arvestatav  $\beta$ -karoteeni allikas sisaldades antud pigmenti ühikumassi kohta 10 korda rohkem kui näiteks porgandid. Kuigi loodusliku  $\beta$ -

karoteeni tootmine on kasvanud, on 90% kaubanduses müüdavast siiski sünteetiliselt toodetud, vaatamata faktile, et loodusliku  $\beta$ -karoteeni imendumine ja toime on paremad. (Klein, Buchholz 2013; Bishop, Zubeck 2012; Tempesta *et al.* 2010)

Astaksantiin on antioksidantse toimega karotenoidpigment, mis on toimele vähemalt 10 korda tugevam kui  $\beta$ -karoteen ja 1000 korda efektiivsem kui vitamiin E. *Haematococcus* on suurim loodusliku astaksantiini allikas, mis moodustab 1,5-3% (mõnede allikate põhjal isegi kuni 4%) vetika kuivmassist. Vaatamata loodusliku astaksantiini suuremale tõhususele, tarbitakse siiski 95% sünteetiliselt toodetud pigmenti. (Heimann, Huerlimann 2015; Bishop, Zubeck 2012; Buchholz, Klein 2013)

Fükotsüaniini sisaldab suurel hulgal tsüanobakter *Spirulina platensis*. Sellel pigmendil on tugevad antioksidantsed ja põletikuvastased omadused, mistõttu on see leidnud rakendust funktsionaalsetes toitudes ja ka farmaatsiatööstuses. (Bishop, Zubeck 2012)

Tsüanobaketritel (*Aphanizomenon ja Spirulina*) on ka kõrge klorofüll sisaldus, 1-2% KA. Uuringute kohaselt stimuleerib klorofüll maksatööd, suurendab sapi sekretsiooni ja tagab üldise tervisliku heaolu. (Spolaore *et al.* 2005)

Mikrovetikaid kasutatakse ka toiduainete loodusliku värvina. Astaksantiin on kasutusel toiduvärvina, millel pole leitud ühtki tervist ohustavat kõrvalmõju kuni doosini 20 mg/päevas. Fükotsüaniini kasutatakse laialdaselt värvainena. See võib muuhulgas olla sünteetilise sinise värvi asendaja. Värvainena on see populaarne Jaapanis närimiskummide, serbettide, kommid, gaseeritud jookide ja wasabi toonimisel. Sinise värvaine tootmine sellest vetikast on ühtlasi ka arendatud Jaapani firma, Dainippon Ink & Chemicals, poolt. (Klein, Buchholz 2013)

Ohufaktoriks mikrovetikate rakendamisel toiduainetööstuses peetakse suurt reostuse riski, kuna vetikaid viljeletakse peamiselt avatud tiikides. Paljudes uuritud vetikaproovides leiti kriitiline bakterite kontsentratsioon. Analüüsides *Chlorella* proove leiti ka tsüanobakterite poolt põhjustatud reostus. (Klein, Buchholz 2013)

Üldiselt võib öelda, et mikrovetikate kasutamine toiduainetööstuses on üks paremini arenenud valdkondi ning erinevaid liike kasutatakse inimeste hüvanguks mitmetel eesmärkidel. Seda näitavad ka tabelis 3 toodud tootmismahud toiduainetööstuse tarbeks ning tootmisettevõtted üle maailma.

**Tabel 3.** Toiduainetööstuse jaoks toodetavate mikrovetikate biomassi maht aastas.

<b>Liik</b>	<b>Biomassi tootmismahd KA (tonni/aastas)</b>	<b>Riigid</b>	<b>Allikas</b>
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	USA, India, Iisrael	Bishop, Zubeck 2012
<i>Arthrospira, Aphanizomenon, Nostoc</i>	3000		Klein, Buchholz 2013
<i>Aphanizomenon</i>	500		Bishop, Zubeck 2012
<i>Chlorella</i>		Üle 70 ettevõtte üle maailma	Spolaore et al. 2005
<i>Chlorella</i>	400	Taiwan Chlorella Manufacturing & Co (suurim tootja maailmas)	Spolaore et al. 2005
<i>Chlorella</i>	130-150	Klötze, Saksamaal	Spolaore et al. 2005

Siiski pole kogu tööstusharu potentsiaal kaugeltki veel ammendatud, kuna looduslikku päritolu preparaatide asemel kasutab veel valdav enamus turust sünteetiliselt toodetud ühendeid.

Mikrovetika saaduste kasvupotentsiaal seisneb ka kasvavas trendis tervislikult toituda. Vetikate positiivne mõju tervisele on leidnud kinnitust ning nende kiire kasv võimaldaks rahuldada suurenevat nõudlust. Jätkuvalt toimub uurimis- ja arendustegevus, et leida efektiivsemaid tootmismeetodeid ning uusi vetikaliike, mille omadusi rakendada inimeste tervise parandamiseks. Lähtuvalt vetikate võimest ravida ja ennetada erinevaid haigusi (sealhulgas viirusnakkusi, südamehaigusi ja vähki), on huvi nende vastu jätkuvalt suur. (Bishop, Zubeck 2012)

## 5.2. Mikrovetikatest biokütuste tootmine

Viimastel aastatel on paljud riigid maailmas teinud pingutusi, et vähendada nõudlust fossiilsetest allikatest tulenevatele kütustele. Praegusel hetkel on 88% globaalsest energia tarbimisest pärinev fossiilsetest kütustest nagu nafta, kivisüsi ja maagaas põletamisel. Sellised kütused on taastumatud ja nende varud ammenduvad aja jooksul. Sellest tulenevalt on vajadus leida uusi alternatiivseid strateegiaid energiajulgeoleku tagamiseks ning samuti CO<sub>2</sub> emissiooni vähendamiseks. (Milano *et al.* 2016)

Biokütustes nähakse potentsiaali tuleviku energiavajaduse rahuldamiseks. Esimese põlvkonna biokütuste biomassi tooraineks on toidukultuurid, sealhulgas suhkruroog, suhkrupeet, taimeõlid ja loomsed rasvad. Nendest on biokütuseid toodetud tänaseks juba aastakümneid

ning tootmisettevõtteid võib leida USA-s, Brasiilias ja Euroopa Liidu riikides. Siiski on selliste biokütuste mõju transpordisektorile limiteeritud, kuna nende tooraine kasvatamisel esineb põllumajandusliku maa osas otsene konkurents toidukultuuridega. Teise põlvkonna biokütuseid toodetakse biomassist, mille moodustavad põllumajanduse, metsaraie ja puidu töötlemise jääkproduktid, toidujäätmed ning lisaks kiirekasvulised taime- ja puuliigid nagu näiteks *Jatropha curcas*, *Miscanthus giganteus* ja *Madhuca longifolia*. Sellise biomassi tootmiseks saab kasutada vähemviljakaid maid, mistõttu ei konkureeri see toidutootmisega. Samuti on madalam keskkonnamõju, kuna biomassi tootmiseks ei rajata enamasti eraldi põlde, v.a. juhul, kui biomassi tootmiseks kasvatakse energiavõsa. (Milano *et al.* 2016) Biokütuste klassifikatsioon tooraine alusel on toodud lisas 3.

Kolmanda põlvkonna biokütuste tootmine põhineb vetikatel. Esimesed uuringud ja katsed vetikatest biokütuste tootmiseks tehti juba 1950ndatel aastatel ning järsult suurenes nende võimaluste vastu huvi 1970ndatel USA-s energiakriisi tõttu. Aastatel 1980-1996 toetas *The US Department of Energy (DOE)* veeorganismide programmi mikrovetikate uurimiseks, kasvatamiseks ja nendest õli tootmiseks. Siiski lõpetati toetusprojekt 1996. aastal tõdemusega, et tehnoloogia on liiga kallis, et lähitulevikus kasumlikuks muutuda (Milano *et al.* 2016; *Algae for Biofuel Production*)

Viimasel aastakümnel on huvi taas antud teema vastu märgatavalt suurenenud ning aktiivne uurimis- ja arendustegevus toimub erinevates riikides. Mikrovetikate kasutamise eelised biokütuste tootmisel on:

- kõrge kasvumäär
- kõrge lipiidide saagikus
- vähenõudlik kasvukeskkond
- madal konkurents põllumajandusliku maa ja magevee kasutamisel
- sesoonsete piirangute puudumine viljelemiseks. (Chisti, 2007; Ho *et al.* 2010)

Tabelis 4 on erinevate kultuurtaimede õlisaagikuse ja selle tootmiseks vajamineva maaressursi võrdlus. Sellelt selgub, et mikrovetikate biomass näib olevat ainus reaalne alternatiiv, millel oleks potentsiaali asendada täielikult fossiilseid tooraineid. (Milano *et al.* 2016)

**Tabel 4.** Biokütuste tooraine võrdlus. (Chisti 2007)

	Õli saagikus (õli L/ha/aastas)	Maa ressursi vajadus (M ha) <sup>a)</sup>
<b>I põlvkond</b>		
Mais	172	1540
Soja	446	594
Raps	1190	223
<b>II põlvkond</b>		
Jatropha	1892	140
Palm	5950	45
<b>III põlvkond</b>		
Mikrovetikad 70% õlisisaldusega biomassis	136 900	2
Mikrovetikad 30% õlisisaldusega biomassis	58 700	4,5

<sup>a)</sup> Maaressursi vajaduse katmaks 50% USA transpordikütuste nõudlusest.

Peamised liigid, mida kasvatatakse biokütuste tootmiseks on perekondadest *Botryococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* ja *Nannochloropsis* (Ho et al. 2014). Nagu võib näha tabelist 5, on 20-50% õlisisaldus mikrovetikates üsna tavapärane, kuid teatud kasvutingimustes võib see ületada ka 80% taseme. (Chisti 2007)

**Tabel 5.** Enam kasvatatavate mikrovetikaliikide õlisisaldus kuivaines (Chisti 2007)

Mikrovetika liik	Õlisisaldus KA (%)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i>	28-32
<i>Nannochloropsis</i>	31-68
<i>Nitzschia sp</i>	45-47
<i>Schizochytrium</i>	50-77
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54

Biokütuste tootmiseks eelistatakse kõrge õlisisaldusega liike. Lisaks on oluline lipiidide koostis, kuna toodetava biokütuse kvaliteet (põlemisefektiivsus, küttevõimsus) on suuresti sõltuv sisalduvatest rasvhapetest. Sobivates kasvutingimustes toodavad vetikad peamiselt madala küllastatuse astmega neutraalseid rasvhappeid (nt oleiinhape C18:1), mis on sobilikud biokütuste tootmiseks. (Ho et al. 2014; Milano et al. 2016)

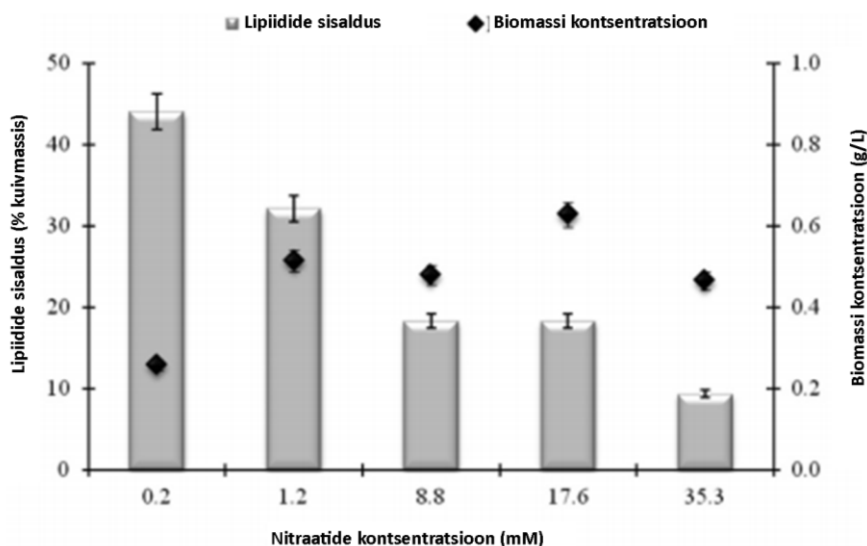
Näiteks magevees kasvavat *Chlorella vulgaris*'t peetakse parimaks vetikatüveks biodiisli tootmisel (Tahir 2014). Looduslikes kasvutingimustes on sellel liigil küll keskpärane õlisisaldus, kuid biokütuste tööstuse jaoks on oluline aspekt selle kasvamisvõime erinevates keskkonnatingimustes (sh. pH taluvus 5-10) ning seejuures võime akumulereida suurel hulgal neutraalseid rasvhappeid. Et saavutada lipiidide sisaldus kuni 58% KA, tuleks manipuleerida kultuuri keskkonnatingimustega. Näiteks lämmastiku vaegus kasvukeskkonnas on



suurendanud oluliselt *C. vulgarise* lipiidide akumulatsioonist. Selle toitainete vähesus viib progressiivse kasvuni lipiidide akumulatsioonil, kuid vähendab samas biomassi kasvu. (Tahir 2014)

Lipiidide koostist ja hulka on võimalik mõjutada erinevate kasvukeskkonna stressoritega: toitainete (eriti N) vaegus, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, soolsus, keskkonna pH muutmine. Lisas 4 on toodud mõned näited erinevate vetikaliikide kohta saavutamaks keskkonnatingimuste muutmisega soovitud komponentide suurendamist vetika biomassis.

Tihti tuleneb aga suurem lipiidide akumulatsioon kasvumäära vähenemise arvelt, mida võib näha ka jooniselt 11. (Harwati *et al.* 2012)



**Joonis 11.** Biomassi kontsentratsioon vs lipiidide akumulatsioon ammenduva lämmastikuressursiga keskkonnas (Harwati *et al.* 2012)

Sellest lähtuvalt on oluline leida optimum biomassi tootlikkuse ja lipiidide saagikuse vahel. Tabelis 6 on toodud näitena soolsuse mõju biomassi kontsentratsioonile, lipiidide tootlikkusele ning kogu lipiidide hulgale liigi *Chlorococcum* näitel. Kuigi kogu lipiidide hulk biomassis oli maksimaalne 2% NaCl sisalduse juures, oli selle soolsuse juures järsk biomassi kontsentratsiooni langus. Seega oleks biomassi kasvatamiseks optimaalne valida 1% NaCl kontsentratsioon, kuna sel juhul säilib ka kõrgem biomassi saagikus. (Harwati *et al.* 2012)

**Tabel 6.** NaCl kontsentratsiooni mõju *Chlorococcum* biomassi kontsentratsioonile ja lipiididele. (Harwati et al. 2012)

NaCl kontsentratsioon (%)	Biomassi kontsentratsioon (KA/g/L)	Lipiidide tootlikkus (mg/L päevas)	Kogu lipiidide hulk (% kuivmassis)
0	0,60	6,2	10,3
0,5	0,65	10,0	15,4
1	0,64	11,3	17,7
2	0,14	4,0	29,8

Vetikatest biokütuse tootmine pole siiski jõudnud majanduslikult kasumliku piirini ja seda erinevate tegurite tõttu. Avatud tiik või suletud fotobioreaktori süsteem toodab tavaliselt rakukontsentratsiooni 0,1-1 g/L ning vetikasaagi koristamine sellise kontsentratsiooniga lahjendatud suspensioonis on väga kulukas. Kultuur ise on aldis saastumisele ja kohalikud liigid võivad selle lihtsasti üle võtta. Ka vetikate õlisaagikus on endiselt suhteliselt madal. (Chair et al. 2009)

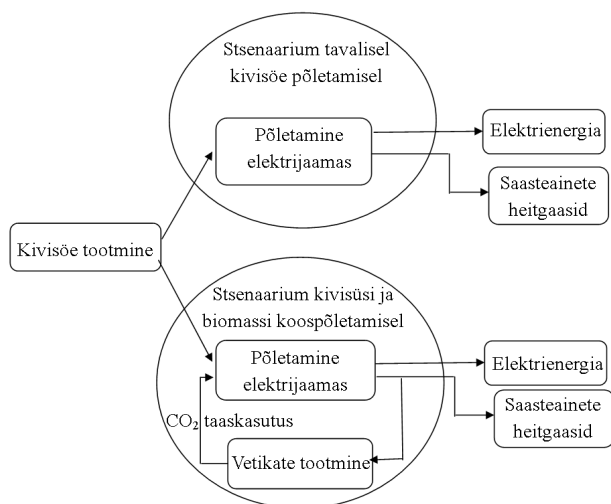
Saagikoristuse protsess moodustab 20-30% biokütuste tootmise kogukuludest. Kuna vetikate lahendamise määr puljongis on väga suur, siis tuleb töödelda suurt mahtu vett ning vajaliku kuivaine kättesaamine on kulukas protsess. Innovaatilised insener-tehnilised lahendused saagikoristamise protsessi tõhustamiseks, peaksid aitama protsessi kuluefektiivsemaks muuta.

Eppnik (2016) toob välja, et biokütuste tootmine järgneva 20 aasta jooksul ei paista olevat kuigi teostatav alternatiiv fossiilsetele kütustele, arvestades viimaste hinnataset. Lipiididest ja süsivesikutest saadavate biokütuste (biodiisel, biometaan, bioetanol) konkurentsivõimeline biomassi tootmise hind oleks praeguse turuseisu juures 300 €/tonn. Arvestades aga tänaste tehnoloogiate juures mikrovetikate tootmist, tööjõu- ja energiakulu, kujuneb biomassi hinnaks 2000 €/tonn. (Eppnik 2016)

### 5.3. Mikrovetikad ning elektri- ja soojusenergia

Atmosfääri paiskuvad kasvuhoonegaasid on kasvavas tarbimisühiskonnas üha suurenev probleem. Suur hulk elektrienergiast genereeritakse kivisöe põletamisel elektrijaamades ning sellel on märkimisväärne mõju keskkonnale. Oodatav kivisöe tarbimine maailmas kasvab umbes 56% aastatel 2007-2035. Alternatiiviks peetakse siinkohal kivisöe põletamist koos biomassiga. Koopõletamine on kuluefektiivne lähenemine elektrienergia tootmiseks, mis samal ajal vähendab oluliselt kasvuhoonegaaside emissiooni ning võetigi algselt kasutusele sel eesmärgil. Joonisel 12 võib näha võrdlust elektri tootmiseks tavapärase kivisöe

põletamisel ja koospõletamisel. (Milano *et al.* 2016) Teise stsenaariumi puhul kasutatakse ära põletamisel vabanevat heitgaasi biomassi tootmiseks, mis tähendab vähenenud saasteaineid atmosfääri. Biomass jõuab ringluses tagasi põletisse, mis koospõletamisel tähendab taas veidi väiksemat emissiooni, millest osa läheb uue biomassi tootmiseks.



**Joonis 12.** Biomassi koospõletamine kiviõiega (Milano *et al.* 2016)

Kultiveerides mikrovetikaid ning kasutades samal ajal ära elektrijaamast vabanevat CO<sub>2</sub>, võib oluliselt vähendada CO<sub>2</sub> emissiooni atmosfääri ja kiviõie-biomassi koospõletamine võib genereerida lisanduvat energiat. Asendades elektrijaamades kiviõie mikrovetikate biomassiga on kasvuhoonegaaside emissioon veelgi väiksem, kuid siinkohal tuleb siiski arvesse võtta, et mikrovetikate tootmisprotsess nõuab ka energiasisendit ja toitaineid, mis on samuti olulised argumendid keskkonnamõjule. Seega on vajalik leida tasakaal mikrovetikate tootmise ja koospõletamise vahel, et protsess oleks võimalikult keskkonnasõbralik. (*Ibid*)

### 5.3. Teised rakendusvaldkonnad

Üheks potentsiaalseks rakendusvaldkonnaks on orgaanilised väetised. Uuringud on näidanud, et sünteetilised kemikaalid, millest on valmistatud paljud kaasaja väetised ja pestitsiidid, mõjutab negatiivselt inimeste tervist ning võivad olla mõnede vähkkasvajate allikaks. Euroopa rajab teed orgaaniliste väetiste kasutamisel keemiliste asemel. Kasvav maailma rahvastik seisab silmitsi faktiga, et praegune toidu tootmise süsteem suudab ilma kemikaalväetisteta varustada vaid umbes 1/5 maailma populatsioonist. Seega ei ole väetiste kasutamise lõpetamine võimalik lahendus. Vetikate biomassi kasutamine keemiliste väetiste asemel võib mitte ainult saavutada samu tulemusi, vaid hinnanguliselt isegi suurendada

kultuuri saagikust 10-40%, mida näitasid Texase Ülikooli uurimused. Teatud kindlat liiki vetikaid võib kasutada maapinnal orgaanilise väetisena kas toorelt või poolkomposteerunud vormis. Vetikaid on võimalik kasvatada tiikides, töötlemaks farmidest voolavat toitaineerikast heitvett; toitaineterikas vetikamass on siis võimalus kokku koguda ja taaskasutada väetisena, mis potentsiaalselt vähendab ka viljeletava põllukultuuri tootmiskulusid. Lisaks on leitud, et vetikatel põhinevad väetised võivad toimida kui looduslikud pestitsiidid ning vähendada ka kultuuri veetarbimist kasvutsükli vältel. (Algae Production Systems; Chair *et al.* 2009)

Vetikate biomassi on võimalik kuivatada, pressida ning granuleerida väga lihtsalt. Seda granuleeritud sööta võib kasutada erinevat liiki eluskarja jaoks loomadest lindude ning kaladeni. Uuringud on näidanud, et vetikatel põhinev sööt on meelepärase erinevates loomakarjades ning veistel on märgata siledamat karva. Kuivatatud vetikatel on pikk säilivusaeg ja granuleeritud kujul on seda lihtne ladustada ja transportida. Samuti on näha, et äärmuslikel juhtudel, põua ja toidupuudusel on vetikatoit on kasutatav ka inimtoiduks. (Algae Production Systems) Spolaore *et al.* (2005) on märkinud, et suisa 30% maailmas toodetavatest vetikatest müüakse loomasöödaks ning üle 50% kogu *Arthrospira* toodangust läheb söödalisandiks. Sagedamini kasvatatavad liigid on *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis* jt. (Spolaore *et al.* 2005)

Nagu eelpool toodust nähtub, on mikrovetikatel mitmeid rakendusvaldkondi, sealhulgas väga kaalukad teemad, millele otsitakse lahendusi kogu maailmas.

## **5.5. Probleemid ja võimalikud lahendused**

Vetikate biotehnoloogia on progresseerunud võrdlemisi aeglaselt. Piirav faktor on efektiivse suuremahulise tootmistehnoloogia puudumine. Mitmed mikrovetikate rakendused nõuavad ühe liigi kasvatamist kontrollitud viljelemissüsteemis. Lähtuvalt sellest vajadusest pannakse rohkem rõhku suletud fotobioreaktorite arendamisele. Siiski tuleb ületada veel palju insenertehnilisi probleeme, et arendada kuluefektiivne tootmissüsteem. (Janssen 2002)

Üks tehniline väljakutse on seotud mikrovetikate biomassi lahjendatusega kasvukeskkonnas, tüüpiliselt 0,5-1 kg/m<sup>3</sup> avatud tiigis ja 5-10 kg/m<sup>3</sup> fotobioreaktoris. Vett tuleb töödelda väga suurtes mahtudes kultiveerimise, koristamise ja eriti kuivatamise vältel. See viib kõrge elektri- ja soojusenergia tarbimiseni ning kõrgete kogukuludeni. (Delrue *et al.* 2012)

Tootmiskulude vähendamiseks on uurimise alla võetud biokütuste tootmine koos reovee käitlemisega, mida peetakse enim tõenäoliseks majanduslikuks rakenduseks lühiperspektiivis. Heitvesi sisaldab hulganisti toitaineid (lämmastik ja fosfor) ning seda oleks võimalik integreerida mikrovetikate biomassi tootmisesse. See annab võimaluse eemaldada kemikaalid ja orgaanilised saasteained, raskemetallid ja patogeenid heitveest, tootes samal ajal biomassi. CO<sub>2</sub> rikas heitvesi tagab soodsa kasvukeskkonna, kuna tasakaalustab „Redfieldi suhte“ (süsiniku, lämmastiku ja fosfori molekulaarne suhe mere orgaanilises aines C:N:P = 106:16:1) reovees, võimaldades paremaid tootmistulemusi, vähenenud toitainete taset käideldud heitvees ning suurenenud lipiidide tootlust. Samuti on oluliseks aspektiks minimaalne magevee kasutamine biokütuste tootmiseks. Sellist integreeritud lähenemist peetakse üheks perspektiivseimaks alternatiiviks kuluefektiivse vedela biokütuse ja taastuva energia tootmiseks. (Brennan, Owende 2009; Paniagua-Michel 2015)

Eppnik (2016) toob välja, et saavutamaks mikrovetikate tootmise ja rakendamise kuluefektiivsust ja toodete suuremat konkurentsivõimet, on vaja kasutada ära kõik biomassi komponendid, s.o. valgud, süsivesikud, rasvad, vitamiinid, värvained ja muud väiksemad komponendid. Ainult ühe lõpp-produkti eesmärgil vetikate kasvatamine pole rentaabel ning väärindada tuleks kõik komponendid erineva otstarbega toodeteks. (Eppnik 2016)

## KOKKUVÕTE

Vetikad on oma ehituselt lihtsad ja primitiivsed taimed ning see on võimaldanud neil ellu jääda ja kohaneda väga erinevates keskkonnatingimustes – maapinnal ja vees, soolastes ja magedates veekogudes, külmas ja soojas. Lisaks on nende liigiline koosseis väga mitmekesine ning enamust pole veel teadus suutnud veel määratledagi. Tänapäeva tootmisettevõtetes, kus vetikaid kasvatatakse kaubanduslikul eesmärgil, kasutatakse ära neid vetikatele bioloogilisi omadusi.

Tootmisettevõtetes enim kasvatatavad mikrovetikate liigid on *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Botryococcus*, *Nannochloropsis*, *Spirulina* ja *Aphanizomenon*. Viimased kaks on prokariootsed tsüanobakterid, mis sarnanevad oma ehituselt rohkem bakteritega, kuid viimastes klassifikatsioonides, käsitletakse neid siiski koos vetikatega.

Mikrovetikad vajavad kasvuks valgust, vett, toitaineid ja CO<sub>2</sub>. Enamik mikrovetikaid on autotroofsed, s.t. viivad kasvuks läbi fotosünteesi. Valgusallikana kasutatakse peamiselt päikesevalgust kui looduslikku ressursi. Siiski suudavad vetikad päikeseenergiat absorbeerida vaid fotosünteesiliselt aktiivse kiirguse lainepikkustel 400-700 nm, mis esindab 42,3% kogu energiast valgusspektrumis. Selle probleemi ületamiseks on näiteks fotobioreaktorites võimalus kasutada kunstlikku valgust, kuid see sisend muudab tootmisprotsessi oluliselt kallimaks. Maksimaalse tõhususe tagamiseks, peab arvesse võtma ka vetikate kontsentratsiooni lahuses ning tagamaks valguse läbipääsu, on tootmissüsteemid madalad (avatud tiigid) või diameetrilt väiksed (fotobioreaktorid).

Vesi on mikrovetikate tavapärane kasvukeskkond. Olulisemad parameetrid seejuures on pH tase ja soolsus. Kasvukeskkonna pH tase on liigispetsiifiline. Küll aga mõjutab see erinevaid rakuprotsesse ning kui liigi jaoks sobivat pH taset ei suudeta säilitada, viib see kultuuri kokkuvarisemiseni. pH taset reguleeritakse tavaliselt CO<sub>2</sub> lisamisega. Soolsus on samuti oluline parameeter. Looduslikult magevees kasvavad vetikad ei suuda tihti soolases vees kasvada. Samas merevee vetikatele on see võtmetähtsusega. Kõige halotolerantsem liik on *Dunaliella salina*, mis on võimeline elama isegi 35% soolusega vees (tavapärane merevee soolsus on 3,5%). Kuna enamik mikroorganisme ei suuda sellises keskkonnas ellu jääda, on

selle vetikaliigi saastumise risk kõrge soolsusega vees minimaalne. Nii pH kui ka soolsuse reguleerimisega on võimalik mõjutada lipiidide ja süsivesikute akumulereerumist vetikates.

Toitained, eriti makrotoitained on võtmetähtsusega vetikate kasvamiseks. Peamised makrotoitained on lämmastik ja fosfor ning biomassi kasvu mõjutab ka nende suhe. Lämmastiku osakaal kasvukeskkonnas on märgatavalt suurem ning selle toitaine vajadus biomassi tootmiseks on üsna kõrge – hinnanguliselt on tarvis 50-80 kg lämmastikku, et toota 1000 kg biomassi. Lämmastiku kontsentratsiooniga manipuleeritakse kasvukeskkonda suurendamiseks lipiidide akumulereerumist vetikates. Viimati mainitud eesmärki täidab see enamikul juhtudest hästi, kuid samas kaasneb sellega tihti järsk langus biomassi tootlikkuses. Sellest tulenevalt peaks tootmine olema optimeeritud maksimaalsele õli tootlikkusele, leides optimumi lämmastiku kontsentratsiooni ja biomassi kasvu vahel.

CO<sub>2</sub> on autotroofse viljelemise puhul peamine süsiniku allikas. Tavapäraselt päädib kõrgem süsiniku kontsentratsiooni määr kõrgema biomassi tootlikkusega, kuid seejuures on tendents pH taseme liigseks langemiseks viljelemiskeskkonnas, mis võib pärssida mikrovetikate kasvu.

Autotroofse tootmissüsteemi kõrval on järjest enam tähelepanu saanud ka heterotroofne viljelemine, kuna mitmetel kasvatatavatel vetikaliikidel (sh. *Chlorella*) on ka heterotroofsed omadused, s.t. nad on võimelised omastama eksogeenseid orgaanilisi toitaineid. Sellise tootmissüsteemi eeliseks on sõltumatus valguskiirgusest (mis eelpool mainituna oli võrdlemisi ebaefektiivne parameeter). Mitmed vetikaliigid on näidanud märkimisväärselt suuremat biomassi tootlikkust heterotroofsetes kasvutingimustes. Selle tootmissüsteemi puuduseks on aga suuremad kulud süsinikuallikale, mis muudab tootmise kallimaks.

Peamised kasvatustehnoloogiad on avatud tiigi süsteemid ja fotobioreaktorid. Neist esimesed on suurtootmises enim rakendust leidnud tänu võrdlemisi madalatele ehitus- ja opereerimiskuludele. Samas on avatud süsteemis biomassi tootlikkus suhteliselt madal. Lisaks esinevad selle tehnoloogia puhul probleemid vee aurumise, CO<sub>2</sub> defitsiidi, temperatuuri kõikumiste ja ööpäevaste valguse-pimeduse tsüklite näol. Lähtuvalt nendest kitsaskohtadest saab avatud süsteemides kasvatada ainult kiirekasvulisi liike lühikese viljelemisprotsessi käigus. Fotobioreaktorid on loodud mainitud probleemide ületamiseks ning selles süsteemis on olulised keskkonnaparameetrid kontrollitavad (pH, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, temperatuur). Samuti on biomassi saagikus tunduvalt kõrgem. Antud tehnoloogia vastu räägivad peamiselt

aga kõrged kapitali-, opereerimis- ja hoolduskulud. Sellest lähtuvalt on suurtootmises valdavalt siiski kasutusel avatud süsteemid vaatamata oma puudustele.

Tehnoloogiline kitsaskoht on ka ebaefektiivne saagi koristamine. Kuna vetikakontsentratsioon lahuses on väga madal, vetikamassi kättesaamiseks tuleb töödelda suurt mahtu vedelikku, mis on väga kulukas protsess.

Mikrovetikad on enim ja edukaimalt rakendust leidnud toiduainetööstuses. Nende kõrget rasvade, valkude, süsivesikute, vitamiinide ja pigmentide sisaldust on kasutatakse ära toidulisandites, funktsionaalsetes toitudes ja tervist edendavates preparaatides. Vetikad on väärtuslikuks proteiiniallikaks sisaldades suuremas kontsentratsioonis valke, kui tavapärastelt tarbitavad toiduained. Lisaks suudavad vetikad toota kaheksat vajalikku aminohapet, mida inimorganism ise ei suuda sünteesida. Ka mikrovetikate poolt toodetud lipiidid on inimese tervise jaoks olulised, sisaldades muuhulgas vajalikke  $\omega$ -3 ja  $\omega$ -6 rasvhappeid, mida organism ise ei tooda. Lisaks leidub vetikate rasvhapete koostises veel eikosapentaeenhape (EPA), millel oluline trombivastane mõju ning dokosaheksaeenhape (DHA) mõjuga neuroloogilistele kudedele. Ka vitamiinide ja pigmentide allikana on vetikaid laialdaselt kasutus leidnud ning on tuvastatud nende märkimisväärselt suurem mõju ja imendumine võrreldes sünteetiliselt toodetavatega. Siiski tarbib maailmas suurem osa tänapäeval veel sünteetiliselt toodetud preparaate.

Oluline vetikate kasutusvaldkond toiduainetööstuses on ka värvained. Neis sisalduvaid pigmente, klorofüll, karotenoidid ja fükobiliinid kasutatakse laialdaselt looduslike ja ohutute toiduvärvidena.

Teine suur ja maailma mastaabis oluline rakendusvaldkond on biokütused, mis pole siiski masstootmisesse veel jõudnud. Mikrovetikaid on juba pool sajandit selles valguses palju uuritud, kuna teoreetiliselt on neil potentsiaal asendada fossiilsest toorainest tulenevaid kütuseid. Siiski on tänased tootmistehnoloogiad liialt kallid, et see võiks lähitulevikus konkurentsivõimeliseks alternatiiviks muutuda. Siiski on kasvavas tarbimis- ja heaoluühiskonnas kütuste järele järjest suurem nõudlus ning teiselt poolt üha rohkem mürgiseid heitgaase, mistõttu jätkub antud valdkonnas intensiivne uurimis- ja arendustegevus.

Suurenevaks probleemiks on ka tööstusest eralduvad kasvuhooonegaasid. Selle probleemi leevendamiseks on pakutud kivisöe koospõletamist koos biomassiga, kus samaaegselt toimub ka biomassi tootmine. Protsessi panus heitgaaside leevendamisse on seotud biomassi



tootmiseks vajamineva CO<sub>2</sub> sidumisega otse tootmisest. Siiski pole see rakendusvaldkond märkimisväärse mõjuga.

Veel on vetikad ja neid leiduvad väärtuslikud komponendid leidnud edukat rakendamist loomasöötades ja looduslike väetistena.

Lahendusena tänastele probleemidele nähakse biomajanduslikku lähenemist vetikate tootmisele – s.t. vetikaid ei kasvatata ainult ühe lõpp-produkti eesmärgil, vaid väärindatakse kõik komponendid väärtuslikeks toodeteks. Selline kompleksne lähenemine aitaks vetikate tootmist muuta kuluefektiivsemaks ning saaduste hinda konkurentsivõimelisemaks.

Samuti on juba esimesed sammud tehtud vetikate kasvatamise integreerimisel heitvee käitlemisega. Olme-, põllumajanduslik- ja tööstuslik heitvesi sisaldab suurel hulgal toitaineid, mis on vajalikud just vetikate kasvatamiseks. Vetikad seovad keskkonnast toitaineid ning ühtlasi puhastavad heitvett. Biomassi tootmise kontekstis vähendab see kulusid veele ja toitainetele, mis moodustavad arvestatava osa kogu tootmiskulust.

Efektiivsuse suurendamiseks uuritakse jätkuvalt ka erinevaid mikrovetikaliike ja nende tüvesid, et leida paremate omadustega liike, mis võiksid efektiivsemalt fotosünteesida ning akumulierida soovitud ühendeid. Samal eesmärgil on spekuleeritud ka praegu tuntud ja määratletud vetikaliikide geneetilise muundamisega.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. **Benemann, J., Polle, J.** (2012) Photosynthetic Efficiency and Biomass Productivity of Microalgae Mass Cultures [http://algaebiomass.org/wp-content/gallery/2012-algae-biomass-summit/2010/06/T1\_Wed\_1030\_JBenemann.pdf] (27.04.2016)
2. **Bishop, W. M., Zubeck, H. M.** (2012) Evaluation of Microalgae for Use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. Nutrition & Food Sciences. [http://www.omicsonline.org/evaluation-of-microalgae-for-use-as-nutraceuticals-and-nutritional-supplements-2155-9600.1000147.pdf] (17.05.2016)
3. **Bondioli, P., Bella, L. D., Rivolta, G., Zitelli, G. C., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Ciaramonti, D., Tredici, M. R.** (2012) Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. Bioresource Technology [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412003744] (17.05.2016)
4. **Brennan, L., Owende, P.** (2010) Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002408] 10.05.2016
5. **Chisti, Y.** (2007) Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262]
6. **Delrue, F., Setier, P.-A., Sahut, C., Cournac, L., Roubaud, A., Peltier, G., Froment, A.-K.** (2012) An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. Bioresource Technology [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412002489] 30.04.2016
7. **Dormido, R., Sanchez, J., Duro, N., Dormido-Canto, S., Guinaldo, M., Dormido, S.** (2014) An Interactive Tool for Outdoor Computer Controlled Cultivation of Microalgae in a Tubular Photobioreactor System. [http://www.mdpi.com/1424-8220/14/3/4466/htm] 8.05.2016
8. **Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., Teixeira, A.-J.** (2010) Third generation biofuels from microalgae. [http://www.formatex.info/microbiology2/1355-1366.pdf] 18.05.2016
9. **Eppink, M.** (2016) Biosystems Engineering 2016. [http://video.emu.ee/biosystems\_engineering\_2016.html] 15.05.2016
10. **Grima, E.M., Belarbi, E.-H., Fernandez, F.G.A., Medina, A. R., Chisti, Y.** (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economic. Biotechnology Advances. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000502] 12.05.2016
11. **Grobbelaar, J.U.** (2004). Algal biotechnology: real opportunities for Africa. South African Journal of Botany. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462991530274X]
12. **Grobbelaar, J.U.** (2013). Mass Production of Microalgae at Optimal Photosynthetic Rates. [http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/45158.pdf] 15.04.2016
13. *Haematococcus pluvialis*. [https://www.researchgate.net/figure/266513648\_fig7\_Figure-3-3-Palmelloid-cells-left-and-right-red-cysts-of-Hamatococcus-pluvialis-Note] 7.05.2016
14. **Harwati, T.U., Willke, T., Vorlop, C.T.** (2012) Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. Bioresource Technology. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412010127] 15.05.2016
15. **Heimann, K., Huerlimann, R.** (2015). Chapter 3 – Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. Handbook of Marine

- Microalgae. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007761000030>] 20.04.2016
16. **Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S.** (2010) *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresource Technology*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410011132>] 03.05.2016
  17. **Ho, S.-H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang J.-S., Kondo, A.** (2014) Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review. *Biotechnology Advances*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975014001475>] 15.05.2016
  18. **Ho, S.-H., Chang, J.-S., Lai, Y.-Y., Chen, C.-N. N.** (2014)<sup>a</sup> Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. *Bioresource Technology*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414000352>] 2.05.2016
  19. **James, G.O., Hocart, C. H., Hillier, W., Price, G. D., Djordjevic, M. A.** (2013) Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241201440X>] 15.05.2016
  20. **Janssen, M.** (2002) Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield. [<http://web.mit.edu/~pweigele/www/AlgalFuel/Janssen%20thesis%20-%20cultivatio.pdf>]
  21. **Jesus Raposo, M-F., Costa de Morais, R-M-S, Bernardo de Morais, A.-M.-M.** (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Health Sciences*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320513004578>] 9.05.2016
  22. **Jimenez, C., Cossio, B. R., Labella, D., Niell, F. X.** (2003) The Feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602001187>] 4.05.2016
  23. **Khalil, Z., Mohsen, M. S. A., Salwa E.-S., Kobbia I. A.** (2009). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. [<http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-009-0292-z>] 3.05.2016
  24. **Klein ,B., Buchholz, R.** (2013) 20 – Microalgae as sources of food ingredients and nutraceuticals. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857093431500202>] 9.05.2016
  25. **Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y.** (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. 2009 [<https://www.palmbeachstate.edu/programs/biotechnology/Documents/Paper3.pdf>] 16.05.2016
  26. **Liu, J., Yuan, C., Hu, G., Li, F.** (2012) Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 Under Nitrogen Limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-012-9639-2>] 5.05.2016
  27. **Milano, J., Ong, H.C., Masuki, H.H. Chong, W.T., Lam, M.K., Loh, P.K., Vellayan, V.** (2016) Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115015336>] 17.05.2016
  28. **Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., Lee, K.** (2012) Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412011042>] 16.05.2016

29. **Paniagua-Michel, J.** (2015) Chapter 31 – Bioremediation with Microalgae: Toward Sustainable Production of Biofuels. Handbook of Marine Microalgae. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007761000315] 7.05.2016
30. **Santos, A.M., Janssen, M., Lamers, P.P., Evers, W.A.C., Wijffels, R.H.** (2011) Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. Bioresource Technology. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411015720] 29.04.2016
31. **Siaut, M., Culine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G.** (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. [http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-11-7] 16.05.2016
32. **Singh, J., Saxena, R.C.,** Handbook of Microalgae. (2015) Academic Press [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007761000029] (17.05.2016)
33. **Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A.** (2006) Commercial application of microalgae. Journal of Bioscience and Engineering. [https://www.researchgate.net/publication/7208920\_Commercial\_application\_of\_microalgae] 14.05.2016
34. **Suen, Y., Hubbard, J.S. Holzer, G., Tornabene, T.G.** (1987) Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp.QII under different nitrogen regimes. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04137.x/epdf?r3\_referer=wol&tracking\_action=preview\_click&show\_checkout=1&purchase\_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase\_site\_license=PUBLICATION\_OUTSIDE\_OF\_LICENSE\_PERIOD] 25.04.2016
35. **Zhang, T.-Y., Hu, H.-Y., Wu, Y.-H., Zhuang, L.-L., Xu, X.-Q., Wang, X.-X., Dao, G.-D.** (2016) Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116002161] 10.05.2016
36. **Tafreshi, A.H., Shariati, M.** (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of applied Microbiology. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x/full] 27.04.2016
37. **Taher, H., Al-Zuhair, S., Marzouqi, A.A., Haik, Y. Farid. M.** (2015) Growth of microalgae using CO<sub>2</sub> enriched air for biodiesel production in supercritical CO<sub>2</sub>. Renewable Energy. [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148114004728] 6.05.2016
38. **Tahir, S.** (2014) Raceway-based production of microalgae for possible use in making biodiesel. [http://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/5621/02\_whole.pdf?sequence=2&isAllowed=y] 13.05.2016
39. **Tempesta, S., Paoletti, M., Pasqualetti, M.** (2010) Morphological and molecular identification of a strain of the unicellular green alga *Dunaliella* sp. isolated from Tarquinia Salterns [file:///C:/Users/kasutaja/Downloads/11653-12653-1-PB.pdf] 19.04.2016
40. **Tredici M. R., Rodolfi L.,** (2004). Patent WO 2004/074423 (2004) to University of Florence. [https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004074423] 28.04.2016
41. **Wen, Z., Johnson, M.B.** (2009) Microalgae as a Feedstock for Biofuel Production. [https://pubs.ext.vt.edu/442/442-886/442-886\_pdf.pdf] 17.04.2016

42. **Üveges, V., Tapolczai, K., Krienitz, L., Padisák, J.** (2012) Photosynthetic characteristics and physiological plasticity of an *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria, Nostocaceae) winter bloom in a deep oligo-mesotrophic lake (Lake Stechlin, Germany) [<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10750-012-1103-3>] 15.05.2016
43. **XU, Y., Boeing, W. J.** (2014) Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. Renewable and Sustainable Energy Reviews. [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114000124>] 30.04.2016
44. Algae Production Systems [[www.algaeproductionsystems.com/algae.html](http://www.algaeproductionsystems.com/algae.html)] (14.05.2016)
45. Algal Production. Fisheries and Aquacultures Department of FAO. [<http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e06.htm#b13-2.3.1.3.%20pH>] (15.05.2016)
46. *Arthrospira platensis*. [[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrospira\\_platensis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrospira_platensis)] (15.05.2016)
47. *Botryococcus braunii* Kuetzing. [[http://ccala.butbn.cas.cz/sites/default/files/styles/ccala\\_big/public/ccala\\_collection/13448/ccala220Botryococcusbraunii004.jpg](http://ccala.butbn.cas.cz/sites/default/files/styles/ccala_big/public/ccala_collection/13448/ccala220Botryococcusbraunii004.jpg)] 7.05.2016
48. Cyanobacteria Image Gallery [<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>] 7.05.2016
49. *Dunaliella salina*. [<http://algalimento.itccanarias.org/wp-content/uploads/2013/02/produccion.png>] 7.05.2016
50. Microbioengineering [<http://microbioengineering.com/products/>] 18.05.2016
51. Morphology and Taxonomy. Introduction [[http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/english/b/b1\\_01.asp](http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/english/b/b1_01.asp)] 5.05.2016
52. Protist Kingdom. Amoeba, chlorella. (2012) [<http://www.slideshare.net/SECBIO/amoeba-Chlorella> ] 7.05.2016
53. Sinivetikad ehk tsüanobakterid [<http://moritz.botany.ut.ee/~olli/aldoc/03Cyano08.pdf>] 7.05.2016



# THE ANALYSIS OF PRODUCTIVITY AND APPLICATIONS OF MICROALGAE

## Summary

The aim of the present Bachelor Thesis is to analyze productivity and applications of microalgae. The paper gives an overview of 1) microalgal biology and different species; 2) requirements for cultivation; 3) different cultivation technologies and 4) microalgal applications.

Microalgae are known as one of the oldest organisms on the Earth. They are very primitive plants without stems, leaves and roots. Due to their simple construction they may survive in different environments. There is a huge amount of different species and only a small part of them have been determined. The most well-known and cultivated algae are *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Botryococcus*, *Nannochloropsis*, *Spirulina* and *Aphanizomenon*.

Most of the microalgae are phototrophic which means they need light for growth. Usually natural sunlight is used for large-scale production. Important components for cultivation are also nutrients, especially nitrogen and phosphorus. They also need CO<sub>2</sub> as carbon source. For optimal biomass growth the suitable temperature of the medium should be retained. Salinity and pH level are also important factors considering biomass growth and lipid accumulation.

Mainly two production systems are used – open (raceway) ponds and photobioreactors. Open pond systems are more common in large-scale production because of lower capital and operating costs. However, biomass productivity is lower than photobioreactors and cultivation environment is very difficult to control. Photobioreactors provide higher growth rate due to control of the culture medium, but the capital investments are very high and therefore the system is not commonly used in large-scale production.

Microalgae have successfully been used in food industry considering their valuable nutrients, vitamins and pigments. Essential compounds among others are important amino acids and fatty acids that can not be synthesized by human organism. The main products are food additives and nutraceuticals. Pigments are widely used as natural colorings.

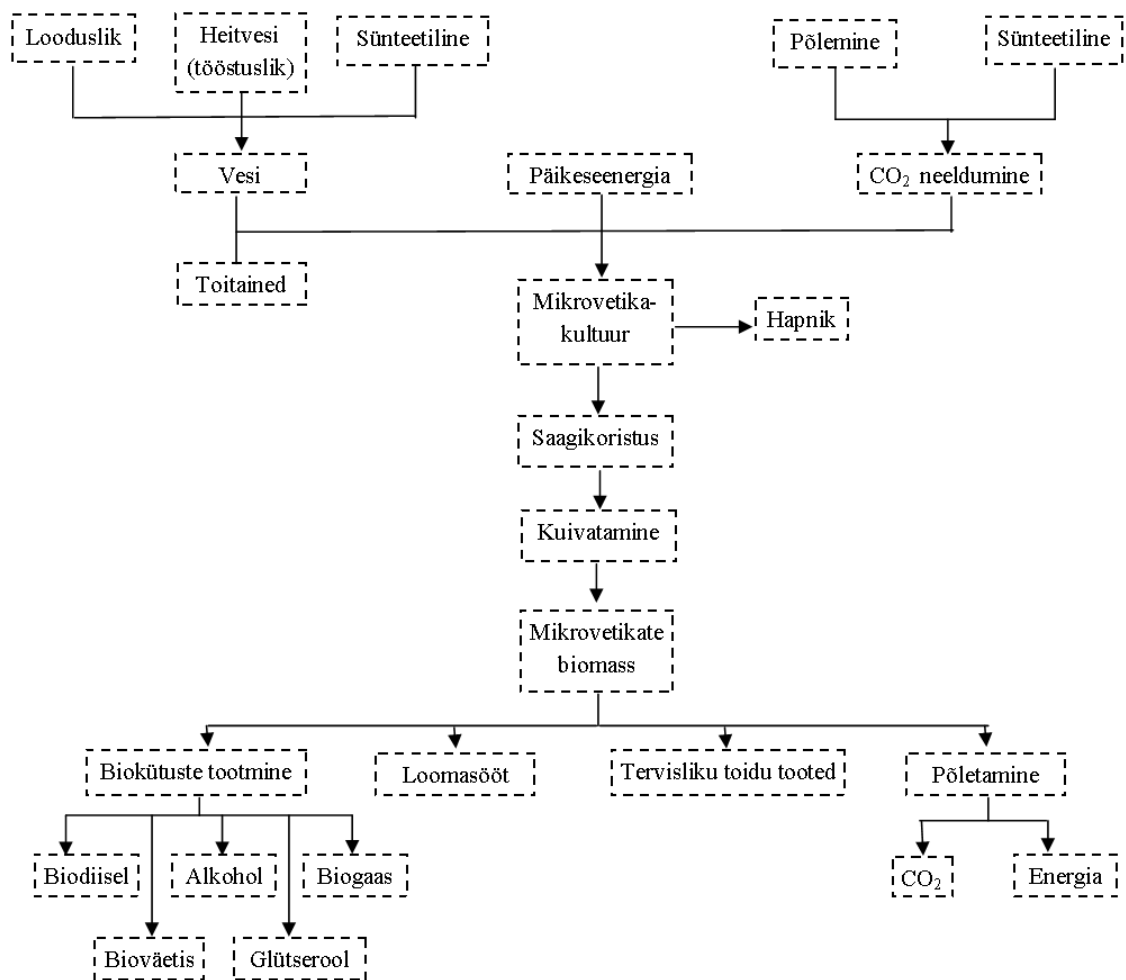
In last 50 years microalgae have been intensively investigated considering biofuels. It is supposed to have the potential to replace fossil fuels but until now the technologies are far too expensive to produce biofuels with competitive price.

As the concentration of algal biomass is very low, to restore the biomass from a huge amount of liquid in different stages needs to be processed and all these technologies are expensive.

Biorefinery is a keyword to make the microalgal products more competitive. It means all the compounds of microalgae should be used to produce valuable goods. At the moment more common is to focus on one product which is irrational and expensive. Microalgae cultivation has nowadays also tried to integrate with sewage treatment. Domestic, agricultural and industrial sewage include a lot of nutrients like N and P which are exactly needed for biomass cultivation. In addition, no or less fresh water will be needed for cultivation. There are also genetic investigations to find new species or strains with better characteristics for autotrophic cultivation. Strains genetic engineering also seems to be a possibility.



**Lisa 1.** Biomassi tootmise skeem ja võimalikud rakendused erinevate lõpp-produktide näol. (Milano et al. 2016)



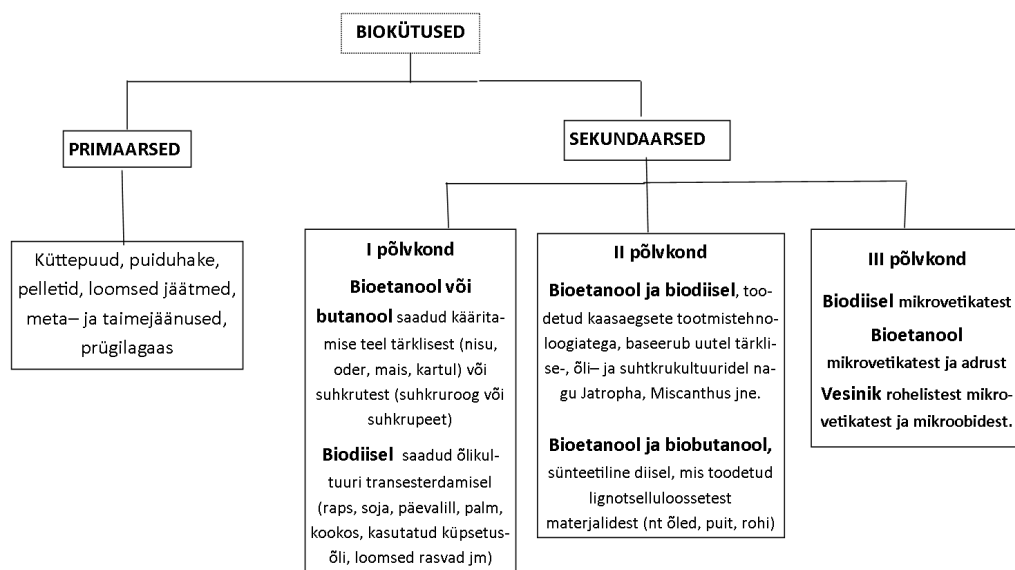


**Lisa 2.** Green Wall Panel - reaktor fotosünteetiliste mikroorganismide tööstuslikuks kultiveerimiseks.



Käesolev leiutis kujutab kuluefektiivset reaktorit fotosünteetiliste mikroorganismide kultuuride viljelemiseks, lihtne muuta suuremaks tööstuslikul tasemel ja võimeline saavutama kõrget mahuproduktiivsust ning kõrget rakukontsentratsiooni. Koosneb kultuuri kambri, mis on valmitatud läbipaistvast materjalist suuresilmalise võrkstruktuuriga fotosünteesi võimaldamiseks. (Tredici, Rodolfi 2004)

**Lisa 3.** Biokütuste klassifikatsioon. Dragone et al. (2010)



**Lisa 4.** Süsivesikute/lipiidide akumulatsioon erinevates mikrovetikates varieeravas keskkonnastressi situatsioonis.

Kohandatud Ho et al. 201

Liik	Keskkonna stressor	Eesmärk	Tulemused	Allikas
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Kiirgusintensiivsust suurendati 60-lt 420 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ -ni	Süsivesikud	* Süsivesikute sisaldus suurenes 15%-lt 38%-ni * Biomassi tootlikkus suurenes ligikaudu 3 korda	Ho et al. 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	Temperatuuri suurendati 5°C-lt 20°C-ni	Süsivesikud	* Süsivesikute sisaldus vähenes 70%-lt 50%-ni * Spetsiifiline kasvumäär suurenes temperatuuri suurendamisega, kuid siis vähenes taas temperatuuri edasisel tõstmisel 5°C võrra 25°C-ni.	Hosonso et al. 2009
<i>Nannochloropsis</i>	N vaegus	Lipiidid	* Lipiidide sisaldus suurenes 39%-lt 69%-ni * Biomassi tootlikkus vähenes märkimisväärselt	Bondioli et al. 2012
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Soolsus NaCl kontsentratsiooni suurendati 0,5 -1,0 M-ni	Süsivesikud	* Triglütseriidide sisaldus suurenes 40%-lt 57%-ni * Kasvumäär jäi enam-vähem samaks antud soolsuse vahemikus	Takagi et al. 2006
<i>Chlomydomonas reinhardtii</i>	Soolsus (NaCl kontsentratsiooni suurendati 0 -1,0 M-ni	Tärklise TAG	* Tärklise sisaldus suurenes ligikaudu 4 korda	Siaut et al. 2011

